

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Angefertigt unter der Leitung von Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Evaluierung eines beadbasierten Immunoassays zum Nachweis enteropathogener *Yersinia* spp. bei Schlachtschweinen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Franziska Gabriele Wilfert
aus Hof

München 2014

**Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München**

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Joachim Braun

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis

Korreferent/en: Prof. Dr. Cornelia Deeg
Univ.-Prof. Dr. Mathias Ritzmann

Tag der Promotion: 08. Februar 2014

„Unsere Wünsche sind Vorgefühle der Fähigkeiten, die in uns liegen,
Vorboten desjenigen, was wir zu leisten imstande sein werden.“

Johann Wolfgang von Goethe

Meinen Eltern

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	VII
I Einleitung.....	1
II Literaturübersicht.....	3
1 Lebensmittelhygiene und Veterinary Public Health.....	3
1.1 Zoonosen	3
1.2 Prävalenz von Gastroenteritisserregern.....	4
1.3 Visuelle Fleischuntersuchung.....	5
1.4 <i>Yersinia</i> spp. als Lebensmittel-assoziierte Pathogene	6
1.5 Maßnahmen zur Bekämpfung von Yersinien	7
1.5.1 Schlachtbetrieb	7
1.5.2 Lebensmittel	8
1.6 IgG als Screeningfaktor der Yersiniose	9
2 Überblick über enteropathogene <i>Yersinia</i> spp.	11
2.1 Geschichtliches	11
2.2 Taxonomie	11
2.3 <i>Yersinia enterocolitica</i>	12
2.4 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	12
2.5 Pathogenität.....	13
2.5.1 Plasmidkodierte Virulenzfaktoren	13
2.5.2 Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren.....	14
2.6 Infektion.....	16
2.6.1 Pathogenese	16
2.6.2 Mensch	17
2.6.3 Schwein	18
2.6.4 Behandlung	18

2.7	Epidemiologie.....	19
2.7.1	Mensch.....	19
2.7.2	Schwein.....	20
2.8	Diagnostik der Yersiniose.....	22
3	Schnellnachweismethoden	24
3.1	PCR.....	24
3.2	ELISA.....	25
3.3	Beadassay	27
3.3.1	Die Luminex xMAP® Technologie	28
3.3.1.1	Beads.....	29
3.3.1.2	Multiplexität	30
3.3.1.3	Beschichtungsmöglichkeiten.....	30
3.3.1.4	Kopplungsverfahren	31
3.3.1.5	Testabarbeitung	31
3.3.1.6	Analyse und Auswertung	33
3.3.1.7	Kontrollen.....	35
3.3.1.8	Beschichtungsfehler und Möglichkeiten, diese zu beheben.....	35
3.3.1.9	Vor- und Nachteile des Beadassays	36
III	Material und Methoden.....	38
4	Material	38
4.1	Seren und Fleischtropfsaftproben	38
4.2	Antigene	39
4.3	Inkubations- und Fluoreszenzkontrolle.....	41
4.4	Detektormoleküle	42
4.5	Chemikalien	43
4.6	Puffer.....	44
4.7	Lösungen	45
4.8	Verbrauchsmaterialien	45

4.9	Geräte	46
4.10	Referenzmethode	47
5	Methoden.....	48
5.1	Probenaufbereitung.....	48
5.2	Herstellung des Beadassays.....	48
5.2.1	Verwendete Antigene	48
5.2.2	Kopplung der Antigene	49
5.2.2.1	Aktivierung der Beads	50
5.2.2.2	Vorverdünnung der Antigene	52
5.2.2.3	Kovalente Kopplung der Antigene an die Mikrosphären	53
5.2.2.4	Blockierung der beschichteten Beads	54
5.2.2.5	Überführen der beschichteten Beads in Lagerpuffer	55
5.2.3	Kopplung der Inkubationskontrolle und der Fluoreszenzkontrolle	55
5.2.4	Abschließende Überprüfung der beschichteten Beadpopulationen ...	56
5.2.4.1	Herstellung eines Testmixes	56
5.2.4.2	Messung des Testmixes	56
5.2.5	Messung des Beadmixes.....	57
5.2.6	Überprüfung der gekoppelten Antigene auf ihre Reaktivität	58
5.2.6.1	Serumverdünnung.....	58
5.2.6.2	Testdurchführung.....	59
5.2.7	Kopplung und Überprüfung von drei Funktionsmustern.....	59
5.3	Einstellung der Detektormoleküle.....	60
5.3.1	Schachbrettitration.....	60
5.3.2	Einzelbestimmung der Fluoreszenzkontrolle	61
5.3.3	Einsatz von Streptavidin-PE der Hersteller Prozyme und Moss	61
5.3.4	Streptavidin-PE von Prozyme und Moss im Test mit Serum	62
5.3.5	Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin.....	62
5.3.6	Titration mit Vorinkubation von Biotin und Streptavidin-PE.....	62

5.4	Einstellung der Inkubationskontrolle.....	64
5.5	Einstellung der Beschichtungskonzentrationen für YopH und YopN	64
5.6	Anwendung des hergestellten Beadassays mit Serum	64
5.7	Messung des Testes	65
5.8	Auswertung des Assays	65
5.9	Reproduzierbarkeit mit porzinem Serum	68
5.10	Fleischtropfsaftverdünnung.....	68
5.11	Anwendung des hergestellten Assays mit FTS.....	69
5.12	Reproduzierbarkeit mit FTS	69
5.13	Referenzmethode	69
5.14	Sensitivität und Spezifität	70
IV	Ergebnisse	72
6	<i>recomBead</i> Yersinia pig.....	72
6.1	Abschliessende Überprüfung der beschichteten Beadpopulationen	72
6.2	Überprüfung der gekoppelten Antigene auf ihre Reaktivität	72
6.3	Einstellung der Detektormoleküle.....	73
6.3.1	Schachbretttitration.....	73
6.3.2	Nachtestung der FK zur Fehlerquellenaufspürung	77
6.3.3	Einsatz von Streptavidin-PE der Hersteller Prozyme und Moss	77
6.3.4	Streptavidin-PE von Prozyme und Moss im Test mit Serum	78
6.3.5	Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin	83
6.3.6	Titration mit Vorinkubation der Detektormoleküle	85
6.3.7	Vorinkubation versus Anti-Schwein-IgG-R-Phycoerythrin.....	87
6.4	Einstellung der Inkubationskontrolle.....	89
6.5	Einstellung der Beschichtungskonzentrationen für YopH und YopN	90
6.6	Auswertung der Seren.....	92
6.7	Reproduzierbarkeit	95
6.8	Fleischtropfsaftverdünnung	98

6.9	Auswertung des FTS.....	100
6.10	Reproduzierbarkeit.....	101
7	Referenzmethode	104
8	Sensitivität und Spezifität.....	105
8.1	Sensitivität und Spezifität für Serum.....	105
8.2	Sensitivität und Spezifität für FTS	105
V	Diskussion	107
9	<i>recomBead</i> Yersinia pig.....	107
9.1	Herstellung des Assays.....	107
9.2	Einstellung der Detektormoleküle.....	107
9.3	Einstellung der Inkubationskontrolle.....	110
9.4	Antigene YopH und YopN	110
9.5	Auswertung des Assays	111
9.6	Reproduzierbarkeit.....	113
9.7	Fleischtropfsaftverdünnung	113
10	Untersuchung der Feldproben.....	114
10.1	Ergebnisse der Proben	114
10.2	Prävalenz in vergleichbaren Studien.....	114
10.3	Vorkommen der Erreger in anderen Staaten	115
11	Speziesdifferenzierung.....	115
12	Sensitivität und Spezifität	116
13	Vor- und Nachteile im Vergleich zur Referenzmethode.....	116
14	Schlussfolgerung und Ausblick.....	118
VI	Zusammenfassung	120
VII	Summary	121
VIII	Literaturverzeichnis.....	122
IX	Abbildungsverzeichnis.....	132
X	Tabellenverzeichnis.....	135

XI	Danksagung	137
	Anhang	138
1	Auswertung Serum im Beadassay/ELISA	138
2	Auswertung Fleischtropfsaft im Beadassay/ELISA	165

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ail	Attachment Invasion locus
AK	Antikörper
BK	Beschichtungskonzentration
BSA	Bovines Serumalbumin
Ca ²⁺	ionisiertes Kalzium
CCP	Critical Control Point
CIN-Agar	Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar
CO	Cut Off
COI	Cut Off Index
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid
EG	Europäische Gemeinschaft
EFSA	European Food Safety Authority
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
EU	Europäische Union
FM	Funktionsmuster
FTS	Fleischtropfsaft
h	Stunden
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Point System
HLA-B27	Histokompatibilitätsantigen B-27
IgA	Immunglobulin A
IgM	Immunglobulin M
IgG	Immunglobulin G
IK	Inkubationskontrolle
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
FK	Konjugatkontrolle
LcrV	low-calcium-responsive-V-antigen
LPS	Lipopolysaccharid
min	Minuten
MES	2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure
MIT-HCl	2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Hydrochlorid
MFI	Median Fluorescence Intensity
Myf	Mucoid <i>Yersinia</i> factor
NaCl	Natriumchlorid
NaOCl	Natriumhypochlorit
NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFGE	Pulsfeldgelelektrophorese
PsaA	pH6 Antigen A
pYV	Yersinien Virulenzplasmid
QS	Qualitätssicherung
R & D	Reinigung und Desinfektion
RNA	Ribonukleinsäure
RKI	Robert-Koch-Institut
rpm	Rotationen pro Minute

s	Sekunden
SA	Streptavidin
SKG	Serumkontrolle G
SV1	Serumverdünnung 1
SV2	Serumverdünnung 2
SVP	Serumverdünnungspuffer
TMB	Tetramethylbenzidin
Tris	2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
Tween	Polyoxyethylen(20)sorbitan-monolaurat
VAG-A	V antigen of pathogenic <i>Yersinia</i>
virF	Virulenzplasmidregion F
Vf	Verdünnungsfaktor
VTEC	Verotoxin-bildende <i>Escherichia coli</i>
WHO	World Health Organisation
YadA	Yersinienadhäsionsprotein A
YOP	<i>Yersinia</i> Outer Protein
YpkA	<i>Yersinia</i> Proteinkinase A
Ysc	<i>Yersinia</i> secretion
Yst	<i>Yersinia</i> heat stable enterotoxin

I EINLEITUNG

Erkrankungen durch enteropathogene Yersinien liegen nach *Campylobacter* und Salmonellen auf Platz drei der häufigsten bakteriellen Zoonosen in Deutschland und der Europäischen Union (EU) (ROSNER et al., 2010). Über die Hälfte der im Jahr 2008 bestätigten Fälle in der EU stammen allein aus Deutschland. Die Yersiniose zählt damit zu den wichtigsten infektiösen Erkrankungen, die durch Nahrungsmittel übertragen werden (ROSNER et al., 2010). Im Jahr 2012 wurden in Deutschland 2.706 bestätigte Yersiniose-Fälle, bedingt durch *Yersinia (Y.) enterocolitica*, beim Robert-Koch-Institut registriert (RKI, 2013).

Bei enteropathogenen Yersinien handelt es sich in erster Linie um typische Durchfallerreger mit normalerweise unkompliziertem Verlauf, nicht selten wird dieser jedoch durch eine ausgeprägte Klinik in Form einer Pseudappendizitis oder durch eine nachfolgend auftretende Polyarthritits erschwert (BOTTONNE, 1997; LAITENEN et al., 1972; ROSNER et al., 2010). Als Hauptübertragungsweg gilt unzureichend erhitztes Schweinefleisch (TAUXE et al., 1987). Zwar besteht in Deutschland nach §6 und §7 des Infektionsschutzgesetzes Meldepflicht für die Infektion mit *Y. enterocolitica* beim Menschen, allerdings wird aktuell kein regelmäßiger Screeningtest an Schlachttieren durchgeführt.

Bestehende Nachweismethoden für enteropathogene Yersinien erfordern derzeit entweder das Vorhandensein des Erregers im Organismus (Anzucht des Erregers, PCR) oder sie bieten nicht die Möglichkeit zwischen einer Infektion mit *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* zu unterscheiden (ELISA) (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2010a; THOERNER et al., 2003). Mit dem Antikörpernachweis per Beadassay soll in Zukunft hingegen die Möglichkeit bestehen, innerhalb kurzer Zeit eine hohe Anzahl von Proben zu testen und gleichzeitig zwischen *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* zu differenzieren. Probenmaterial kann dabei sowohl Serum als auch Fleischtropfsaft (FTS) sein. Letztgenannter könnte durch die bereits bestehende Salmonellendiagnostik ein generelles Screening auf enteropathogene Yersinien unkompliziert möglich machen.

Bis jetzt gibt es in Deutschland keine flächendeckenden aussagekräftigen Studien zur Seroprävalenz enteropathogener Yersinien bei Schlachtschweinen. Noch weniger ist bis dato über die Verteilung der beiden Spezies, *Y. enterocolitica* und *Y.*

pseudotuberculosis bekannt. Ziel der Arbeit war es deshalb, mit dem zu entwickelnden Beadtest die Grundlage für Studien über eine flächendeckende differenzierte Prävalenz der beiden enteropathogenen Yersinioseerreger zu schaffen.

II LITERATURÜBERSICHT

1 LEBENSMITTELHYGIENE UND VETERINARY PUBLIC HEALTH

Der heute immer häufiger Verwendung findende Begriff „Veterinary Public Health“ wurde 1999 von der World Health Organisation (WHO) definiert als „die Summe aller Beiträge zum körperlichen, geistigen und sozialen Wohlbefinden des Menschen durch das Verständnis und die Anwendung der Tiermedizin“. Darunter fallen Diagnose, Überwachung, Epidemiologie, Prophylaxe und Elimination von durch Zoonoseerreger bedingten Krankheiten (WHO, 2012). Dreiviertel aller neu beim Menschen bekannt gewordenen Erkrankungen sind durch Erreger verursacht, die bei Tieren oder Produkten tierischen Ursprungs vorkommen (WHO, 2012). Viele der Erreger haben das Potential, sich über weite Entfernungen auszubreiten und so zum globalen Problem zu werden (WHO, 2012). Veterinary Public Health ist damit ein wichtiger Bestandteil an der Gesunderhaltung der Menschheit.

Aufgrund der zunehmend gemeldeten Fälle von Lebensmittelinfektionen und –intoxikationen sowie der Entdeckung einer wachsenden Zahl via Nahrungsmittel übertragbaren Zoonoseerregern gewinnt das Feld der Lebensmittelsicherheit verstärkt an Bedeutung innerhalb der Gesellschaft. Im gleichen Zug werden damit auch bessere und schnellere Nachweismethoden dieser so genannten „foodborne pathogens“, also lebensmittelhygienisch relevanter Erreger, benötigt. Diese Aufgabe obliegt insbesondere der Forschung im Bereich der Fleischhygiene, da kaum ein anderes Lebensmittel als Fleisch bzw. dessen Produkte eine derartige Vielzahl von für den Menschen pathogenen Erregern beherbergen kann (WHO, 2012).

1.1 ZOONOSEN

Als Zoonose wird jede Krankheit definiert, die von Wirbeltieren auf den Menschen übertragbar ist und umgekehrt (WHO, 2012). Von den durch Bakterien, Viren, Parasiten, Pilze sowie durch unkonventionelle Erreger verursachten Erkrankungen sind bis heute über 200 verschiedene bekannt (WHO, 2012). Zu den wichtigsten durch Nahrungsmittel übertragbaren bakteriellen Zoonoseerregern zählen innerhalb der Europäischen Union insbesondere *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., enteropathogene *Yersinia* spp. sowie Verotoxin-produzierende *Escherichia coli*

(VTEC) (EFSA, 2012). Enteropathogene Yersinien beinhalten die beiden Spezies *Y. enterocolitica* sowie *Y. pseudotuberculosis*. Sie alle gelten als typische Enteritisserreger. Ihr Krankheitsbild wird von Durchfall in Verbindung mit Bauchschmerzen und teilweise Fieber geprägt. Zu schwerwiegenden Fällen kann es bei Risikogruppen wie Kindern, alten Menschen, Schwangeren und Immunsupprimierten kommen. Enteropathogene *Yersinia* spp. können, wie auch *Campylobacter* spp., zusätzlich zu Komplikationen wie dem Guillain-Barré-Syndrom oder zu reaktiver Arthritis führen (RKI, 2012).

In Deutschland zählen über 50 Erkrankungen zu den nach §6 und §7 Infektionsschutzgesetz meldepflichtigen Krankheiten. Bei zwei Dritteln handelt es sich dabei um Zoonosen, unter ihnen auch die Infektion mit *Y. enterocolitica* (IFSG, 2000).

1.2 PRÄVALENZ VON GASTROENTERITISERREGERN

Durch die Meldepflicht für lebensmittelbedingte Zoonosen liegen für die Ausbrüche beim Menschen stets aktuelle Zahlen vor (RKI, 2013). Innerhalb Deutschlands publiziert das Robert-Koch-Institut im Geschäftsbereich des Bundesministeriums für Gesundheit regelmäßig ein „Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten“ aus dem die neuesten Entwicklungen entnommen werden können (RKI, 2012). Demnach war im Jahr 2011 *Campylobacter* spp. mit insgesamt 62.906 gemeldeten Fällen die häufigste bakterielle Zoonose, gefolgt von *Salmonella* spp. mit 20.859 Erkrankungen und *Y. enterocolitica* mit 2.706 (RKI, 2013).

Auf Europäischer Ebene kümmert sich die European Food Safety Authority (EFSA) um die statistische Auswertung der Daten aus den einzelnen Mitgliedsstaaten. Auch im innereuropäischen Raum stellt *Campylobacter* spp. seit 2005 den meist-registrierten bakteriellen Gastroenteritisserreger dar (EFSA, 2012). Im Jahr 2009 wurden innerhalb der 27 EU-Länder fast 200.000 Fälle von Campylobacteriose verzeichnet, ca. 110.000 Salmonellosefälle und etwa 7.600 Fälle von durch *Y. enterocolitica* bedingter Yersiniose (EFSA, 2012).

Innerhalb der Ausbrüche, die sicher mit der Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln assoziiert werden konnten, wurden v.a. *Salmonella*, Virusinfektionen und bakterielle Toxine nachgewiesen. Bei den erregerhaltigen Lebensmitteln handelte es sich hauptsächlich um Eier und Eierprodukte, Schweinefleisch

beinhaltende Lebensmittel sowie um fertig zubereitete fleischhaltige Gerichte wie beispielsweise Speisen an Buffets (EFSA, 2012).

1.3 VISUELLE FLEISCHUNTERSUCHUNG

Die heute bedeutenden Zoonosen wie Campylobacteriose, Salmonellose und Yersiniose sind größtenteils nicht makroskopisch am Schlachttierkörper erkennbar (SMULDERS et al., 2012). Vielmehr sind die mikrobiellen Erreger eine inapparente Gefahr für den Menschen. Daher stellt sich die Frage, ob die seit Jahrzehnten angewandte Methodik der pathologisch-anatomischen Fleischschau noch länger zeitgemäß ist (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, 2008). Aufgrund dieser veränderten Fragestellung sieht das europäische Lebensmittelhygienerecht mit der Verordnung (EG) Nr. 854/2004 die Einführung einer risikobasierten Fleischuntersuchung vor. Jene im Jahr 2004 beschlossene Verordnung sieht zusammen mit der drei Jahre später hinzu gekommenen Verordnung (EG) Nr. 1244/2007 die Möglichkeit einer rein visuellen Fleischuntersuchung vor, sofern die Schlachttiere unter kontrollierten Bedingungen und in integrierten Produktionssystemen (QS-Systeme) gehalten wurden, der Lebensmittelunternehmer Informationen zur Lebensmittelkette zur Verfügung stellt und eine gewisse Anzahl an Tieren regelmäßig bezüglich klinisch inapparenter Zoonosen serologisch bzw. mikrobiologisch untersucht wird. Unter kontrollierten Bedingungen werden dabei in Verordnung (EG) Nr. 1244/2007 näher benannte Hygienekriterien wie Schädlingsbekämpfung und Rein-Raus-Verfahren verstanden. Je nach Haltungsform, Herkunftsbetrieb und weiteren Vorabinformationen bzgl. der Schlachttiere soll also am Schlachtbetrieb entschieden werden, ob eine Besichtigung der Tierkörper ausreichend erscheint oder ob eine traditionelle Untersuchung inkl. Palpation und Inzision notwendig ist (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, 2008). Dazu laufen aktuell – initiiert vom Bundesamt für Risikobewertung – Machbarkeitsstudien, in denen geprüft werden soll, inwieweit die generelle Einführung einer risikobasierten Fleischuntersuchung möglich ist (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, 2008). Fakt ist jedoch, dass zukünftige Fleischuntersuchungsverfahren gerade auf die nicht sichtbaren Gefahren, wie Salmonellen, Yersinien und Mykobakterien besser ausgerichtet sein müssen (BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, 2008).

1.4 YERSINIA SPP. ALS LEBENSMITTEL-ASSOZIIERTE PATHOGENE

Als dritthäufigste bakterielle Gastroenteritisserreger in Europa nehmen Yersinien eine wichtige Rolle im Rahmen der Lebensmittelsicherheit ein. Zumeist ist die Ursache von Lebensmittelinfektionen mit enteropathogenen Yersinien empirisch auf den Verzehr von unzureichend erhitztem Schweinefleisch bzw. Rohfleischprodukten zurück zu führen. Allerdings ist die Nachweisrate in rohen Schweinefleischprodukten, exklusive Schweinezungen und -innereien, unter 15 % (DE BOER, 1995; DE BOER und NOUWS, 1991; DOYLE et al., 1981; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001a; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 1999; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001b). Deutlich höher liegt die Nachweisrate im Falle von Hackfleisch, in dem Kopffleisch mitverarbeitet wurde (TAUXE et al., 1987). Bei Fleisch anderer Tierarten, wie z.B. Rind oder Geflügel, konnten die Erreger nur in 2 % der Proben nachgewiesen werden (FUKUSHIMA et al., 1997).

Zwei weitere mögliche Infektionsquellen scheinen Obst und nicht erhitztes Gemüse zu sein. So konnte 1998 in Finnland ein klarer Zusammenhang zwischen dem Ausbruch einer Yersinieninfektion bei mehreren Menschen und dem Verzehr von Eisbergsalat hergestellt werden (NUORTI et al., 2004). Fünf Jahre später ließ sich erneut ein Zusammenhang zu Gemüse herstellen. Dabei handelte es sich um geriebene Karotten, die in einer Schule zu einer Häufung an Erkrankungen führten (JALAVA et al., 2006).

Auch Infektionen über Wasser sind dokumentiert. Sowohl *Y. enterocolitica* als auch *Y. pseudotuberculosis* konnten mit unbehandeltem Wasser in Verbindung gebracht werden (HAN et al., 2003; HIGHSMITH et al., 1977). Es wird angenommen, dass die ursprüngliche Kontamination des Wassers durch den Kot von Nagetieren, Vögeln und Wild erfolgte (STENGEL, 1986). FUKUSHIMA und GOMYODA unterstrichen dies mit dem Nachweis von *Y. pseudotuberculosis* im Kot von Rotwild, Mardern sowie Feldhasen und Enten (FUKUSHIMA und GOMYODA, 1991).

In Bezug auf Milch gibt es lediglich Einzelfallberichte. In Kanada stellte sich für *Y. pseudotuberculosis* ein Zusammenhang mit dem Verzehr von homogenisierter Milch heraus. Allerdings ist eine Kreuzkontamination nicht ausgeschlossen (NOWGESIC et al., 1999). Im Allgemeinen gilt es immer, auch an die Möglichkeit einer Kreuzkontamination durch Küchenpersonal oder mangelhafte Hygiene zu denken (ROSNER et al., 2011).

1.5 MAßNAHMEN ZUR BEKÄMPFUNG VON YERSINIEN

1.5.1 Schlachtbetrieb

Zur Minimierung von Kontaminationsrisiken bei der Schweineschlachtung kommen das Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System sowie die „Gute Hygienepaxis“ zum Einsatz (BORCH et al., 1996). Beim HACCP System werden zunächst anhand einer Gefahrenanalyse kritische Kontrollpunkte festgelegt. Dies ist nur möglich, wenn zum jeweiligen Punkt auch eine Überwachung stattfinden kann. Bei der Produktion von Lebensmitteln tierischen Ursprungs sind bakterielle Kontaminationen von großem Belang für die Lebensmittelsicherheit, unter ihnen enteropathogene Yersinien (BORCH et al., 1996).

Da die Tiere sich untereinander kontaminieren können, ist eine Trennung der Tiere in den Wartebuchten des Schlachthofes, je nach Herkunftsbetrieb, sinnvoll. Desweiteren spielt der Zeitpunkt der letzten Fütterung eine Rolle. Je weniger Darminhalt, desto geringer das Kontaminationsrisiko. Ein wichtiger kritischer Punkt ist deshalb auch das Verschließen des Rektums sowie das Entfernen des Darmtraktes nach der Schlachtung. Bereits 1994 konnte gezeigt werden, dass das Umhüllen des Rektums mittels eines Plastikbeutels die Kontaminationsrate mit *Y. enterocolitica* von 10 % auf 0,8 % senken kann, egal ob von Hand angelegt oder mittels eines Gerätes (NESBAKKEN et al., 1994). Ein weiteres Risiko stellt das durch den Schlachtkörper kontaminierte Wasser der Brühanlage dar. Dieses kann durch den Wasserdruck post mortem in die Lungen der Tiere gelangen (BORCH et al., 1996). NESBAKKEN und Mitarbeiter befassten sich intensiv mit dem Schlachtprozess. Sie postulierten ebenfalls ein hohes Kontaminationsrisiko insbesondere durch die Tonsillen bzw. Lymphknoten. Das Risiko einer Kontamination besteht u.a. bei der Inzision der *Lnn. mandibulares* und anschließender Weiterbenutzung des Messers (NESBAKKEN et al., 2003). Da die Schnellkühlung keinen Einfluss auf die bakterielle Kontamination bzgl. Yersinien zu haben scheint, ist eine Reduzierung bzw. Niedrighaltung der Keimbelastung während des Schlachtprozesses unabdingbar (NESBAKKEN et al., 2008). ANDERSEN et al. konnten keinen Faktor beim Betriebsmanagement finden, der Einfluss auf die Infektion gehabt hätte (ANDERSEN et al., 1991).

In einer Studie in Süddeutschland wurde an 50 Schlachtschweinen in 60 % der beprobten Tonsillen sowie 10 % der beprobten Fäzes *Y. enterocolitica* 4:O3 nachgewiesen, was einer relativ hohen Anzahl entspricht. Die Geschlinge der 50

Tiere hingen an 20 Gestellen. An jedem von ihnen wurde *Y. enterocolitica* nachgewiesen. Besonders an Zunge, Lunge, Herz, Zwerchfell und Leber ließ sich der Erreger nachweisen. All diese Organe hingen zusammen mit den Tonsillen. Lediglich die Nieren, die mit den am meisten kontaminierten Organen keinen Kontakt hatten, waren nur zu 15 % betroffen. Auch in 12 % der Hackfleischproben wurde *Y. enterocolitica* nachgewiesen. Eine zusätzliche Kreuzkontamination über herunterlaufendes Blut sowie Spritzwasser/Wasserdampf während Verarbeitung und Lagerung wurde angenommen (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001a). Ein direkter Zusammenhang zwischen infizierten Schweinen und infiziertem Schweinefleisch, welches im Fleischfachhandel erhältlich ist, gilt als nachgewiesen (ANDERSEN et al., 1991).

1.5.2 Lebensmittel

Die Tenazität von Yersinien in Lebensmitteln ist hoch. Sie haben ein pH-Optimum von 7,6, können sich jedoch in einem pH-Bereich von 4-10 vermehren. Die Empfindlichkeit gegenüber Säuren hängt von der jeweiligen Säure ab. Essigsäure erwies sich in einer Konzentration von 0,16 % bei pH 5,58 bei 22 °C über 48 h als wirksam. Ein ähnlicher Effekt ließ sich mit Weinessig reproduzieren, während Zitronensäure weit hinter der Wirkung von Essigsäure zurück blieb (KARAPINAR und GONUL, 1992). Allerdings besteht ein Unterschied in der Wirksamkeit von organischen zu anorganischen Säuren wie HCl. So können enteropathogene Yersinien einen zweistündigen Aufenthalt bei einem pH-Bereich von 3,0, der durch Zugabe von HCl erzeugt wurde, zu 85 % überstehen. Dies entspricht der physiologischen Passage von Nahrung durch den Magen (DE KONING-WARD und ROBINS-BROWNE, 1995).

Erst ab einer Kochsalzkonzentration von über 7 % findet eine Hemmung des Wachstums statt. Da die in der Nahrungsmittelherstellung für gewöhnlich Verwendung findenden Konzentrationen darunter liegen, kann damit keine Eindämmung der bakteriellen Besiedlung erwirkt werden (ROBINS-BROWNE, 1997).

Yersinien sind als Vertreter der psychrophilen Keime gegenüber niedrigen Temperaturen höchst widerstandsfähig. Sie haben ein Temperaturoptimum von +28 bis +30 °C, eine Vermehrung kann allerdings im Temperaturbereich von 0 bis +37 °C stattfinden. Damit ist auch bei Lagerung im Kühlschrank ein zwar verlang-

samtes, aber stetiges Wachstum möglich (PALONEN et al., 2010; SCHIEMANN, 1989). Selbst nach mehrfachem Einfrieren bei -18 °C und erneutem Auftauen bleiben Yersinien überlebensfähig (TOORA et al., 1992). Im Gegensatz dazu steht eine geringe Stabilität gegenüber Hitze. Bereits eine fünfminütige Erhitzung auf 60 °C, z.B. bei einer Pasteurisierung, tötet die Erreger sicher ab (HEIM et al., 1984).

Durch ihr fakultativ anaerobes Wachstum wird eine Vermehrung auch bei modifizierter Gasatmosphäre ermöglicht, wie sie beispielsweise in Vakuumverpackungen vorkommt (HARRISON et al., 2000). Zwar verringert sich hierbei in der Regel die Wachstumsgeschwindigkeit, eine Reduktion der Bakterienzahl wird jedoch zumeist nicht bewirkt (BARAKAT und HARRIS, 1999; PIN et al., 2000).

1.6 IgG ALS SCREENINGFAKTOR DER YERSINIOSE

Sowohl im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit als auch auf Prävalenzstudien ist ein Screeningfaktor für die Yersiniose beim Schlachtschwein von besonderer Bedeutung. Hierfür würden sich prinzipiell sowohl der Nachweis von IgM als auch von IgG Antikörpern eignen. Vorteil der IgM Antikörper ist ihr schnellerer Anstieg bei einer akuten Infektion. Allerdings fallen sie nach einer durchlaufenen Infektion ebenso schnell wieder ab und sind dann im Blut nicht mehr nachweisbar (GRANFORS et al., 1980; HOOGKAMP-KORSTANJE et al., 1992; HOOGKAMP-KORSTANJE et al., 1988). Dies ist zur Detektion von akuten Infektionen zwar von Vorteil, für die Untersuchung von Schweinebeständen und für Prävalenzstudien, bei denen festgestellt werden soll, ob die Tiere jemals mit dem Erreger Kontakt hatten, jedoch nicht aussagekräftig. Besser hierfür eignet sich der Nachweis von IgG Antikörpern. Sie sind nach durchlaufener Yersinieninfektion noch über einen langen Zeitraum nachweisbar. Beim Menschen sind dies in der Regel Jahre, beim Schwein fehlen hierzu jedoch verlässliche Daten (GRANFORS et al., 1980; HOOGKAMP-KORSTANJE et al., 1992; HOOGKAMP-KORSTANJE et al., 1988). Aufgrund des jungen Schlachalters der Mastschweine mit fünf bis sechs Monaten kann zum Zeitpunkt der Schlachtung allerdings davon ausgegangen werden, dass im Falle einer vorangegangenen Infektion IgG Antikörper nachweisbar sind. Dadurch wird ersichtlich, ob die Tiere innerhalb ihres Lebens in Kontakt mit dem Erreger kamen. Eine Ausnahme hiervon bilden allerdings Ferkel, die jünger als zwei Monate sind, da

eine Serokonversion frühestens 65 Tage post natum, sicher ab Tag 135 post natum zu erwarten ist (NESBAKKEN et al., 2006).

2 ÜBERBLICK ÜBER ENTEROPATHOGENE *YERSINIA* SPP.

2.1 GESCHICHTLICHES

Während *Y. pseudotuberculosis* bereits 1883 erstmals aus einem Meerschwein isoliert wurde, wurde *Y. enterocolitica* erst rund 50 Jahre später unter dem Namen *Flavobacterium pseudomallei* von MC IVER und PIKE beschrieben (BOTTONE, 1997; MCIVER, 1934; SCHIEMANN, 1989). Sie isolierten den Keim aus einem fazialen Abszess eines Mannes, bei dem bereits die zervikalen Lymphknoten beteiligt waren (BOTTONE, 1997).

Beide Erreger wurden bis Mitte des 20. Jahrhunderts verschiedenen Gattungen zugeordnet und erst nach Einführung der Gattung *Yersinia*, zu Ehren von ALEXANDRE YERSIN, dem Erstbeschreiber des Pestbazillus (*Y. pestis*), in einer Gruppe zusammengefasst (FREDERIKSEN, 1964).

2.2 TAXONOMIE

Die Gattung *Yersinia* gehört zu den *Enterobacteriaceae*, die sowohl befähigt sind, sich unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen vermehren zu können. Sie können außerdem Zucker unter Bildung von Säure oxidativ und auch fermentativ spalten (HAHN et al., 2009). Yersinien sind fakultativ anaerobe, gramnegative, teils pleomorphe Stäbchen. Sie bilden keine Sporen, sind katalasepositiv, oxidasenegativ und fermentieren Glukose unter Entstehung von Säure (SMEGO et al., 1999).

Aktuell umfasst die Gattung *Yersinia* 18 verschiedene Spezies. Unter diesen befinden sich die drei mensch- und tierpathogenen Spezies *Y. enterocolitica*, inklusive zweier Subspezies, sowie *Y. pseudotuberculosis* und *Y. pestis*. Während die beiden erstgenannten eine Yersiniose verursachen, ist *Y. pestis* der Erreger der Pest. Daneben befinden sich in dieser Gruppe der Erreger der Rotmaulkrankheit bei den Salmoniden, *Y. ruckeri*, sowie 14 weitere Erreger, die weit in der Umwelt verbreitet sind, jedoch bis jetzt nur in Einzelfällen mit Infektionen in Verbindung gebracht werden konnten (DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN, 2013; FREDRIKSSON-AHOMAA und WACHECK, 2011; HOLT, 1994).

2.3 *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Y. enterocolitica lässt sich aufgrund biochemischer Eigenschaften in sieben Biovarien einordnen (WAUTERS et al., 1987). Biovar 1A beinhaltet die meisten apathogenen Umweltisolate (ALEKSIC und BOCKEMUHL, 1990). In Biovar 1B sind humanpathogene Stämme enthalten, die vorwiegend in Nordamerika und in Japan vorkommen (BOTTONE, 1999). Die für den Menschen pathogenen und in Europa auftretenden Biovarien sind 2, 3 und 4 (ALEKSIC und BOCKEMÜHL, 1996; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2010a). Biovar 3 und 5 können bei Chinchillas, Hasen und Ziegen Erkrankungen auslösen (ALEKSIC und BOCKEMUHL, 1990).

Zudem besteht die Möglichkeit, die Biotypen zusätzlich mittels Oberflächen- (O-) und Geißel- (H-) Antigenen zu serotypisieren (ALEKSIC, 1995). Dies ist insbesondere für Epidemiologie und Pathogenität von großem Interesse. Tabelle 1 zeigt die Zuordnung der als in Amerika und Europa als pathogen erachteten Serovaren zu den entsprechenden Biovarien (ALEKSIC und BOCKEMUHL, 1990; BOTTONE, 1997) (Tab.1). In Deutschland ist Serotyp O:3 mit Abstand am häufigsten bei Infektionen des Menschen nachweisbar, gefolgt von O:9, O:5,27 sowie O:8 in absteigender Anzahl (ROSNER et al., 2010).

Tabelle 1: Einteilung der pathogenen Serovaren nach Biovar
(nach BOTTONE, 1997)

Biovar	Serovar
1B	O:4 ; O:8 ; O:13 ; O:18 ; O:20 ; O:21
2	O:9 ; O:5,27
3	O:1,2,3 ; O:5,27
4	O:3
5	O:2,3

2.4 *YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS*

Eine biochemische Unterscheidung in die verschiedenen Stämme von *Y. pseudotuberculosis* ist grundsätzlich möglich (TSUBOKURA und ALEKSIC, 1995). Allerdings hat dies nur geringfügige klinische Relevanz, da alle bisher isolierten Spezies als pathogen gelten (EFSA, 2007).

2.5 PATHOGENITÄT

2.5.1 Plasmidkodierte Virulenzfaktoren

Allen enteropathogenen Yersinienspezies ist ein 64-75 kb großes Virulenzplasmid, bezeichnet als pYV, gemeinsam. Dieses kodiert eine Vielzahl an Proteinen, unter ihnen den Sekretionsapparat Ysc (Yop secretion) und die sogenannten Yersinia Outer Proteins, kurz Yops, und hält selbst Temperaturen bis zu 55 °C erfolgreich stand (BHADURI et al., 1988; GEMSKI et al., 1980; PORTNOY und FALKOW, 1981; PORTNOY et al., 1981). Die Expression der Proteine ist temperatur- und calciumabhängig. Maximale Ausschüttung findet bei 37 °C und der Abwesenheit von Calcium statt (CORNELIS et al., 1989). Gleichzeitig wird unter diesen Bedingungen das Bakterienwachstum an sich eingeschränkt. Fällt die Temperatur auf 25 °C, findet keine Ausschüttung von Proteinen statt. Im Gegensatz dazu ist in diesem Stadium rege Zellvermehrung möglich (GEMSKI et al., 1980; PORTNOY und FALKOW, 1981; PORTNOY et al., 1981). Dieses Phänomen ermöglicht eine optimale Anpassung des Erregers an die jeweiligen Bedingungen. Auch bei Fehlen des Virulenzplasmides ist eine Invasion in die Zellen der Darmmukosa möglich, jedoch können sich diese im Anschluss daran nicht vermehren und werden vom Wirt abgetötet (LIAN et al., 1987).

Hauptverantwortlich für die Anhaftung am Wirt und damit die Invasion im Bereich des Intestinaltraktes ist das vom Virulenzplasmid exprimierte YadA (Yersinia Adhäsionsprotein A) (PAERREGAARD, 1992). Ob es zur Bildung von YadA kommt, ist abhängig vom Transkriptionsprotein VirF (Virulenzplasmidregion F) bei *Y. enterocolitica* bzw. vom Transkriptionsprotein LcrV (low-calcium-responsive V-antigen) bei *Y. pseudotuberculosis* (CORNELIS, 1998; CORNELIS et al., 1989).

Die Expression der Yops ist der wichtigste plasmidkodierte Pathogenitätsfaktor. Diese lassen sich unterscheiden in „Translokatoren“, die das Eindringen in die eukaryotische Zielzelle ermöglichen, sowie in „Effektoren“, die in das Zytosol der Zielzelle gelangen und dort das Zytoskelett oder eine intrazelluläre Signal-Kaskade angreifen (CORNELIS und VAN GIJSEGEM, 2000).

Zu den Translokatoren zählen YopB, YopD, YopN und LcrV. Sie sind an der Bildung des Typ III Sekretionsapparates beteiligt und ermöglichen damit die Anheftung am Wirt und die anschließende Injektion der Effektorproteine (CORNELIS und VAN GIJSEGEM, 2000). YopB hemmt die Ausschüttung von Tumor-Nekrose-Faktor alpha

(TNF α) aus den Makrophagen und dämmt so die Immunabwehr des Wirtes ein (BEUSCHER et al., 1995). Bei YopD handelt es sich um ein 33 kDa großes Protein (BERGMAN et al., 1991). Es ist verantwortlich für den Transport von YopE in die Zielzelle (ROSQVIST et al., 1991). An der Negativregulation der Expression der Yops bei 37 °C und Anwesenheit von Calcium beteiligt ist das 33 kDa schwere YopN (FORSBERG et al., 1991).

YopE ist hingegen ein Effektorprotein. Dieses 23 kDa schwere Zytotoxin wird allerdings nur ausgeschüttet, solange sich das Bakterium an der Oberfläche einer eukaryotischen Zielzelle angeheftet hat. Es wird nach der Adhäsion in die Zielzelle injiziert und führt dort zur kompletten Zerstörung der Aktinmikrofilamente. Sobald sich die Yersinien intrazellulär befinden, wird kein zusätzliches YopE mehr ausgeschüttet (ROSQVIST et al., 1990; ROSQVIST et al., 1991).

Zudem zählen YpkA (Yersinia protein kinase A), YopH, YopT und YopM zu den Effektoren. Das Protein YpkA ist eine 81,7 kDa schwere Proteinkinase, für die in Versuchen an Mäusen eine essentielle Beteiligung an der Virulenz nachgewiesen wurde. Die genaue Pathogenese ist allerdings bisher unbekannt (GALYOV et al., 1994). Bei YopH handelt es sich um eine Tyrosinphosphatase. Sie dephosphoryliert eukaryotische Zellen, insbesondere in Makrophagen und verhindert damit die Phagozytose (BLISKA et al., 1992). YopT ist eine Cysteinproteinase, die das Aktinzytoskelett der Wirtszelle zerstört. Daneben baut es die GTPase aus der Membran der Zielzelle ab und führt so zu deren Inaktivierung (GUDULA, 2011). Das 42 kDa schwere YopM bindet humanes α -Thrombin und kann erfolgreich mit humanen Thrombozyten um Thrombin konkurrieren (LEUNG et al., 1990; REISNER und STRALEY, 1992). So kann es während des entzündlichen Prozesses extrazellulär Thrombin abfangen und hat dementsprechend eine antiinflammatorische Wirkung (REISNER und STRALEY, 1992).

2.5.2 Chromosomal kodierte Virulenzfaktoren

Für die Virulenz der Yersinien sind neben den plasmidkodierten Virulenzfaktoren auch chromosomal kodierte Faktoren essentiell. Von entscheidender Bedeutung für die Invasion in die Epithelzellen sind sowohl das *inv* Gen (Invasion) sowie das *ail* Gen (Attachment Invasion Locus) (MILLER und FALKOW, 1988). Das 103 kDa schwere Auenmembranprotein Inv ermöglicht die direkte Penetration von

epithelialen Zellen des Darms (ISBERG und LEONG, 1990). Es ist bei allen pathogenen Yersiniaspezies vorhanden. Das Oberflächenprotein Ail wird nur bei *Y. enterocolitica* chromosomal kodiert und dient der Adhäsion (MILLER et al., 1989). Zu diesen Strukturantigenen kommen noch weitere Pathogenitätsfaktoren hinzu, wie z.B. das Yst (Yersinia heat stable enterotoxin) bei *Y. enterocolitica*, das für alle gram-negativen Bakterien charakteristische Lipopolysaccharid (LPS) sowie das Enzym Urease (DE KONING-WARD et al., 1994; DELOR et al., 1990).

Ein weiterer chromosomal kodierter Virulenzfaktor ist das nur bei *Y. enterocolitica* vorkommende Myf Protein (Mucoid Yersinia Factor). Es hat eine Größe von 21 kDa, besteht aus einer polymeren Struktur mit verschiedenen Proteinuntereinheiten, wird bei 37 °C sowie pH 6 exprimiert und ist resistent gegenüber Proteinasen. Kodiert werden die Proteine MyfA, MyfB und MyfC. Das Myf Antigen bildet eine Art Fimbrien bzw. Fibrillae auf der bakteriellen Oberfläche zur besseren Adhäsion aus. In seiner Sequenz bisher einzigartig ist MyfA, bestehend aus 159 Aminosäuren mit einer Masse von 17,38 kDa. Das *myf* Gen ist ausschließlich bei pathogenen Serotypen von *Y. enterocolitica* zu finden. Eine mögliche Rolle von Myf ist die Förderung der intestinalen Kolonisation und die Sekretion des Enterotoxins Yst. Die genaue Funktion ist jedoch noch nicht bewiesen (IRIARTE et al., 1993).

Das nur bei *Y. pseudotuberculosis* vorkommende Gen *psa* kodiert bei 37 °C und pH 6 das Protein Psa (pH6 Antigen) mit einer Masse von 16 kDa. Die genaue Rolle in der Pathogenese ist bisher nicht geklärt (YANG et al., 1996).

2.6 INFEKTION

2.6.1 Pathogenese

Enteropathogene Yersinien besitzen die Fähigkeit ihren Stoffwechsel zu modifizieren, um sowohl bestmöglich in der Umgebung existieren zu können als sich auch im Wirt schnellstmöglich an die veränderten Bedingungen zu adaptieren. Wichtig hierbei ist insbesondere die Expression und Regulation der Virulenzfaktoren. Sie ist abhängig von umgebenden Faktoren wie Temperatur, Ca^{2+} Konzentration und Verfügbarkeit von Eisen (BRUBAKER, 1991; STRALEY und PERRY, 1995). Bei 37 °C und niedriger Ca^{2+} Konzentration, sprich unter den Bedingungen, wie sie im Extrazellularraum zu finden sind, exprimiert das Virulenzplasmid die entsprechenden Proteine, um die intestinale Kolonisation und Invasion der Epithelzellen zu ermöglichen (BRUBAKER, 1991; STRALEY und PERRY, 1995).

Das Ziel enterischer Krankheitserreger ist die Besiedlung des Darmtraktes. Um dies erreichen zu können, ist die unbeschadete Passage des Magens essentiell. DE KONING-WARD und ROBINS-BROWNE konnten in vitro zeigen, dass 85 % der Bakterien einen zweistündigen Aufenthalt bei pH 3,0 ohne Beeinträchtigung überstehen können. Dies entspricht der physiologischen Passage von Nahrung durch den Magen (DE KONING-WARD und ROBINS-BROWNE, 1995). Eine weitere Hürde bei der Kolonisation des Intestinums ist die die Epithelzellen umgebende Mukusschicht. Sie wird umgangen, indem die enteropathogenen Yersinien entweder das Muzin selbst oder andere Komponenten des Mukus metabolisieren, sodass einer Anhaftung an der Bürstensaummembran des Darmes nichts im Wege steht (PAERREGAARD et al., 1991).

Wie in Tierversuchen gezeigt wurde, erfolgt die Penetration der Darmmukosa stets über die M-Zellen, die den Peyerschen Platten aufgelagert sind (PEPE et al., 1995). Dieser Prozess, der im terminalen Ileum stattfindet, wird durch Invasin vermittelt, das an β -Integrin-Rezeptoren an M-Zellen bindet und den Yersinien die Besiedlung der lokalen Lymphfollikel so möglich macht (PEPE und MILLER, 1993). Um in den Peyerschen Platten persistieren zu können, verursacht YadA innerhalb von 72 h sowohl Entzündungen als auch Nekrosen (PEPE und MILLER, 1993). Ebenso zur Zerstörung der Wirtszelle tragen die Yops mit ihren antiphagozytären sowie zytotoxischen Eigenschaften bei (BRUBAKER, 1991; STRALEY et al., 1993).

Im weiteren Verlauf der Infektion dringen die Erreger in die Lamina propria ein und besiedeln von dort aus die mesenterialen Lymphknoten. Schließlich kommt es unter Abszessbildung zu einer Vermehrung der Bakterien in Organen wie Leber, Milz und Nieren. Wie schnell der Erreger eliminiert werden kann, hängt maßgeblich von der Pathogenität des jeweiligen Serovars ab (HANSKI et al., 1989; HEESEMANN, 1990).

2.6.2 Mensch

Die Infektion beim Menschen hat aufgrund des hohen Zoonosepotenzials von enteropathogenen Yersinien erhebliche Bedeutung. Zu einer Infektion kommt es meist durch die Aufnahme des Erregers mit der Nahrung. Als Hauptinfektionsquelle für den Menschen gilt unzureichend erhitztes Schweinefleisch, inklusive Hackfleisch (BONARDI et al., 2007; TAUXE et al., 1987). Das Schwein ist bis jetzt das einzige Tier, bei dem regelmäßig pathogene Stämme gefunden werden konnten (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007).

Daneben ist eine Infektion durch unbehandeltes Wasser, Obst, Gemüse und Salat möglich (BONARDI et al., 2007; HAN et al., 2003; JALAVA et al., 2006; NUORTI et al., 2004). NOWGESIC und Mitarbeiter konnten schließlich auch einen Zusammenhang einer Yersinieninfektion mit homogenisierter Milch herstellen (NOWGESIC et al., 1999). Beachtenswert ist auch, dass eine Kreuzkontamination bei mangelnder Küchenhygiene ebenfalls zu Infektionen führen kann (ROSNER et al., 2011).

Klinische Symptome einer Yersiniose treten nach einer durchschnittlichen Inkubationszeit von fünf Tagen auf und beinhalten Diarrhoe, Fieber, Vomit, Tenesmus, mesenteriale Lymphadenitis und Abdominalschmerz. Bei älteren Kindern und jungen Erwachsenen kommt es gehäuft zu Schmerzen im unteren rechten Quadranten des Abdomens, was häufig fälschlicherweise als eine Appendizitis diagnostiziert wird. Die Symptome halten typischerweise für ein bis zwei Wochen an und sind bei unkompliziertem Verlauf selbstlimitierend (BOTTONE, 1997; ROSNER et al., 2010).

Komplikation einer Infektion mit enteropathogenen Yersinien können eine reaktive Arthritis, Erythema nodosum, Glomerulonephritis und Myokarditis sein. Bei der reaktiven Arthritis handelt es sich um eine postinfektiöse, nicht septische Arthritis. Sie wird ausgelöst durch eine extraartikuläre Infektion und der Erreger ist daher nicht im Gelenk nachweisbar. Prädisponiert scheinen Träger des Histokompatibilitätsantigens

HLA-B27 zu sein (HOOGKAMP-KORSTANJE und DE KONING, 1990). Die klinische Symptomatik einer Polyarthrititis geht meist mit Gelenkschmerzen, -steifheit und -krepitation einher. Zusätzlich beklagt der Patient für gewöhnlich Fieber, Schwäche, gastrointestinale Symptome, Kopfschmerzen und Muskelschmerzen. Die Behandlung kann langwierig sein und nicht alle Patienten erlangen Symptommfreiheit (LAITENEN et al., 1972). In seltenen Fällen kann es zu einer schwierig zu therapierenden chronischen Polyarthrititis kommen (VAN DER HEIJDEN et al., 1997). Septikämische Verläufe, teils auch mit letalem Ausgang aufgrund eines Multiorganversagens, bleiben die Ausnahme und können z.B. nach einer Transfusion von kontaminierten Blutkonserven vorkommen (BOTTONNE, 1997).

2.6.3 Schwein

Das Schwein nimmt den Erreger oral-alimentär auf, meist durch eine Schmierinfektion mit erregerhaltigem Kot (NEUBAUER et al., 2001). Mögliche Reservoirs können dabei insbesondere Vögel und Nagetiere sein (FUKUSHIMA und GOMYODA, 1991). Die Erkrankung beim Schwein verläuft in der Regel ohne klinische Symptomatik. Zu einer Manifestation kann es jedoch aufgrund ungünstiger Umwelt- oder Haltungsbedingungen kommen (NEUBAUER et al., 2001). So sind im Verlauf einer Infektion von Ferkeln mit *Y. enterocolitica* 4/O:3 katharrhalische Enteritis, Serositis, Arthritis und Pneumonie beschrieben (ZHENG, 1987).

2.6.4 Behandlung

Zumeist ist eine antimikrobielle Behandlung nicht notwendig, da die Infektion mit enteropathogenen Yersinien in der Regel selbstlimitierend ist (BOTTONNE, 1997). Ist eine medikamentelle Behandlung jedoch indiziert, gilt es, auf die entsprechend wirksamen Antibiotika zurück zu greifen. Mittel der Wahl sind hier Cephalosporine der dritten Generation, Aminoglykosidantibiotika sowie Fluorchinolone (ABDEL-HAQ et al., 2006; GAYRAUD et al., 1993).

2.7 EPIDEMIOLOGIE

2.7.1 Mensch

Aufgrund §7 des Infektionsschutzgesetzes (IfSG) besteht in Deutschland die Pflicht, labordiagnostisch nachgewiesene Erkrankungen mit *Y. enterocolitica* zu melden. Durchschnittlich werden jedes Jahr sieben Infektionen pro 100.000 Einwohner verzeichnet. Dies waren im Jahr 2012 insgesamt 2.698 gemeldete Fälle (RKI, 2013). Die Zahl der gemeldeten Fälle ist im Zeitrahmen von 2002 bis 2008 jedoch insgesamt mit einem Rückgang um 42 % deutlich rückläufig (ROSNER et al., 2010). Dieser Trend ist auch bei anderen durch Gastroenteritisserreger ausgelösten Krankheiten, mit Ausnahme von *Campylobacter* spp., zu beobachten. Die Gründe hierfür sind nicht genau geklärt. Es wäre allerdings möglich, dass verbesserte Kontrollmaßnahmen auf der Seite der Lebensmittelsicherheit sowie eine gesteigerte Hygiene bei der Zubereitung der Speisen durch den Verbraucher einen derartigen Rückgang bewirkt haben (ROSNER et al., 2010). Für *Y. pseudotuberculosis* hingegen besteht keine Meldepflicht und es lassen sich daher keine gesicherten Angaben bzgl. Häufigkeit und Verteilungsmuster der Erkrankungen machen.

Im Gegensatz zu Salmonellen und *Campylobacter* lässt sich bei enteropathogenen Yersinien keine saisonale Häufung feststellen. Lediglich in den Monaten Juni, Juli und September kommt es zu einem geringgradigen Anstieg. In der Regel handelt es sich um Einzelinfektionen. Nur gelegentlich kommt es zu Ausbrüchen, bei denen mehr als zwei Personen beteiligt sind. Auffallend ist, dass die Yersiniose vorwiegend ein pädiatrisches Problem darstellt. Kinder unter fünf Jahren sind zwölfmal häufiger betroffen als der Rest der Bevölkerung. Die Spitze dabei bilden Kinder mit einem Jahr, bei denen im Durchschnitt 108 pro 100.000 Kinder erkranken (ROSNER et al., 2010).

Auch geographisch lässt sich ein Unterschied erkennen. So sind die neuen Bundesländer deutlich öfter betroffen, während in den zwei südlichsten Bundesländern, Baden-Württemberg und Bayern, die wenigsten Fälle gemeldet wurden (ROSNER et al., 2010).

In Europa dominieren Serotyp O:3 und O:9, allerdings wurde in Polen innerhalb der letzten Jahre auch gehäuft der hochpathogene Serotyp O:8 nachgewiesen (BOTTONE, 1997; RASTAWICKI et al., 2009). In Deutschland ist Serotyp O:3 mit

89 % der Infektionen deutlich am stärksten vertreten, gefolgt von Serotyp O:9 mit 6 % und Serotyp O:5,27 sowie O:8 mit je unter einem Prozent. Die restlichen 4 % fallen auf unspezifische Serotypen (ROSNER et al., 2010).

Die Seroprävalenz kann in der deutschen Bevölkerung als relativ hoch angenommen werden. So konnten in einer Studie an 100 klinisch gesunden deutschen Blutspendern bei 33 % im Enzyme Immunoassay bzw. bei 43 % im Immunoblotverfahren Antikörper gegen *Y. enterocolitica* nachgewiesen werden (MÄKI-IKOLA et al., 1997). In einer Studie an 750 gesunden Österreichern konnte im Jahr 2006 eine durchschnittliche Seroprävalenz von Anti-Yersinien IgG Antikörpern von 30 % im Western Blot ermittelt werden (TOMASO et al., 2006). Aufgrund dieser hohen Anzahl kann von einer ebenfalls hohen Menge an subklinischen Infektionen bzw. mangelnder Diagnostik ausgegangen werden, da aufgrund der Meldepflicht die Zahl der gemeldeten Infektionen um ein vielfaches höher sein müsste.

2.7.2 Schwein

Bislang sind in Deutschland keine flächendeckenden Studien hinsichtlich der Prävalenz enteropathogener Yersinien bei Schweinen durchgeführt worden. In einer Studie in Süddeutschland wurde an Schlachtschweinen eine relativ hohe Prävalenz an *Y. enterocolitica* 4:O3 nachgewiesen mit 60 % der beprobten Tonsillen sowie 10 % der beprobten Fäzes (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001a). HENSEL et al. fanden in einer Studie an Fleischtropfsaftroben aus bayerischen Schlachthöfen eine Antikörperprävalenz von 45 % (HENSEL et al., 2004). In einer ähnlichen Studie aus dem gleichen Jahr konnte ebenfalls in Bayern eine Quote von 66 % ermittelt werden (BARTLING et al., 2004). Unter Schlachtschweinen konnten verschiedene Genotypen nachgewiesen werden. Manche sind weit verbreitet und können sich über lange Zeit in einer Population halten (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2010b).

Auch in anderen europäischen Mitgliedsstaaten besteht seit langem das Interesse am Vorkommen von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* bei Schlachtschweinen. In Dänemark wurden im Jahr 1991 2218 frisch geschlachtete Schweine aus 99 Betrieben auf *Y. enterocolitica* Biotyp 4, Serotyp O:3 getestet. Dabei waren 25 % der Schweine positiv. Insgesamt waren 82 % der Betriebe betroffen (ANDERSEN et al., 1991). In einem Schweizer Schlachthof konnten 88 % der Tiere mittels PCR und 34 % der Tiere mittels PCR und kultureller Anzuchtverfahren *Y. enterocolitica* positiv getestet werden (FREDRIKSSON-

AHOMAA et al., 2007). Ebenfalls *Y. enterocolitica* positiv waren 56 % der Schlachtschweine in Finnland, 93 % in Spanien, 44 % in Belgien und 32 % in Italien (KORTE et al., 2004; MARTINEZ et al., 2011). Hohe Werte konnten auch auf dem Baltikum gemessen werden. So fand man bei 89 % der Schlachtschweine in Estland und 64 % in Lettland *Y. enterocolitica* in den Tonsillen (MARTINEZ et al., 2009). In Bezug auf *Y. pseudotuberculosis* existieren weit weniger Zahlen zum Vorkommen in den europäischen Staaten. Während der Erreger bei 2 % bzw. 1 % der beprobten Tiere in Belgien und Italien vorkam, konnte er in spanischen Schlachthöfen nicht gefunden werden (MARTINEZ et al., 2011). Innerhalb der baltischen Staaten betrug die Isolationsrate für *Y. pseudotuberculosis* 5 % in Lettland und 1 % in Estland. Besonders zu betonen an dieser Studie ist, dass bei einem der Tiere in Lettland eine Doppelinfektion mit beiden enteropathogenen Yersinien nachgewiesen werden konnte (MARTINEZ et al., 2009).

Allerdings ist nicht nur das Vorkommen von enteropathogenen Yersinien bei Schweinen im Schlachthof von Interesse für die Lebensmittelsicherheit. In einer Studie in Finnland konnte nachgewiesen werden, dass der bei Schlachtkörpern nachgewiesene Erreger *Y. pseudotuberculosis* auch schon bei den noch lebenden Tieren in ihrem Mastbetrieb vorhanden war. Es wurde weiterhin gezeigt, dass sich unterschiedliche Haltungsbedingungen auf die Prävalenz in den jeweiligen Betrieben auswirken. So wurde ein vermehrtes Auftreten von *Y. pseudotuberculosis* in ökologischer Haltung im Vergleich zu konventioneller Haltung festgestellt. Ebenfalls höher war diese bei steigender Anzahl von Tieren sowie bei direktem Kontakt mit anderen Tieren bzw. der Umwelt (LAUKKANEN et al., 2008). Auch in konventionellen Betrieben und Mastställen erhöht sich das Vorkommen von *Y. enterocolitica* mit steigender Tierdichte (LAUKKANEN et al., 2009; NOWAK et al., 2006).

2.8 DIAGNOSTIK DER YERSINIOSE

Im Falle einer Yersiniose, die mit intestinalen Symptomen einhergeht, ist ein kultureller Nachweis des Erregers zu Beginn der Diarrhoe im Stuhl mittels Direktausstrich auf entsprechenden Nährböden möglich (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2010a). Yersinien wachsen auf den meisten Medien für enterische Keime, allerdings zumeist mit großer Begleitflora. Da *Y. enterocolitica* Laktose sehr langsam fermentiert, stellen sich auf Medien wie MacConkey Agar farblose Kolonien dar. Auch auf Hektoen-Agar bzw. Xyloselysin-Desoxycholat-Agar, denen als Indikator zum Farbumschlag Laktose zugesetzt ist, können die Erreger nicht von denen der normalen intestinalen Mikrobiota, wie z.B. apathogene *E. coli* unterschieden werden. Außerdem sind die Kolonien nach 24-stündiger Inkubation bei 37 °C lediglich so groß wie eine Nadelspitze und deshalb auf dem Hintergrund anderer schnell wachsender enterischer Keime kaum wahrnehmbar (BOTTONNE, 1997). Aufgrund dessen wurden mehrere selektive Medien für den Nachweis von Yersinien entwickelt, z. B. der von SCHIEMANN entwickelte Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin-Agar (CIN-Agar) (SCHIEMANN, 1979). Allerdings fanden FUKUSHIMA und GOMYODA 1986 heraus, dass *Y. pseudotuberculosis* und Genotyp 3/O:3 von *Y. enterocolitica* auf diesem Agar in ihrem Wachstum gehemmt werden und damit nicht nachweisbar sind (FUKUSHIMA und GOMYODA, 1986). Sie entwickelten daraufhin ein Jahr später einen modifizierten CIN Agar, welcher Äskulin enthält. Damit gelingt der Nachweis virulenter *Y. enterocolitica* (VYE-Agar). Großer Vorteil hierbei ist die leichte optische Unterscheidung der roten Kolonien von virulenten Stämmen im Vergleich zu dunklen Kolonien von avirulenten (FUKUSHIMA, 1987). Die Proben werden bei 30 °C 24 h lang im Hinblick auf *Y. enterocolitica* sowie 36-48 h für *Y. pseudotuberculosis* inkubiert (NISKANEN et al., 2002). Um die Isolierung von apathogenen Stämmen auszuschließen, sollte anschließend eine Biotypisierung mittels PCR oder Pulsfeldgelelektrophorese (PFGE) bzw. eine Serotypisierung mittels Antisera vorgenommen werden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2010b; NAJDENSKI et al., 1994).

Im Gegensatz zum direkten Nachweis, zu dem neben dem kulturellen Nachweis auch noch die Polymerasekettenreaktion zählt, werden bei einem indirekten Nachweis Antikörper im Serum bestimmt. Dies erfolgt zumeist durch kommerziell erhältliche Immunoblot- oder ELISA-Testkits. Jene sind im Vergleich zum kulturellen

Nachweis relativ zeitsparend. Sie haben allerdings den Nachteil, dass lediglich eine vorangegangene Infektion nachgewiesen werden kann. Ob aktuell noch ein lebender Erreger im Individuum vorhanden ist, kann damit nicht belegt werden (CROWTHER, 2001).

3 SCHNELLNACHWEISMETHODEN

Die sicherste Möglichkeit, einen vermehrungsfähigen Erreger nachzuweisen, ist ein kultureller Nachweis (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2010a). Allerdings ist dieses Verfahren, wie zuvor erwähnt, aufwändig und zeitintensiv. Im Fall lebensmittelbedingter Krankheitserreger ist jedoch der schnelle Nachweis des Erregers von essentieller Bedeutung im Hinblick auf die Lebensmittelsicherheit. So kann bei einem positiven Befund bereits ein Hinweis an verarbeitende Betriebe übermittelt werden, während die Kontamination durch kulturelle Anzucht des Erregers bestätigt wird. Die für den Schnellauchweis zumeist genutzten Methoden sind aktuell die Polymerasekettenreaktion für einen direkten Erregernachweis und der ELISA zum indirekten Erregernachweis, also zum Nachweis von Antikörpern (BERG et al., 2013). Seit Beginn des 21. Jahrhunderts gewinnt auch der Beadassay, eine Form des Immunoassay, an diagnostischer Bedeutung hinzu (KELLAR und IANNONE, 2002).

3.1 PCR

Eine häufig Verwendung findende Schnellauchweismethode ist die Polymerasekettenreaktion (PCR). Ziel der Methode ist die in vitro Vervielfachung der Ziel-DNA, um diese im Anschluss durch eine Gelelektrophorese als zu einem bestimmten Bakterium zugehörig zu verifizieren (BERG et al., 2013). Vorteil der PCR ist im Falle der Yersiniose die Möglichkeit, gezielt einen bestimmten Serotyp nachzuweisen (JACOBSEN et al., 2005; WANNET et al., 2001). Zudem kann eine Unterscheidung zwischen *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* getroffen werden (NAKAJIMA et al., 1992). Allerdings ist eine PCR immer ein direkter Erregernachweis. Um Yersinien bei Schlachtschweinen mittels PCR nachzuweisen, wird deshalb biologisches Material benötigt, in welchem der Erreger für gewöhnlich nachweisbar ist. Hohe Nachweisquoten erhält man aus Gewebe von Lymphknoten oder aus dem Kot. Der Nachweis von Antikörpern ist durch eine PCR nicht möglich. (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001a).

3.2 ELISA

Der Begriff ELISA steht für „enzyme-linked immunosorbent assay“ und bezeichnet ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, das zur Gruppe der Immunoassay-Verfahren gehört. Es wurden verschiedene ELISA Systeme entwickelt, denen jedoch allen einige Dinge gemeinsam sind. Immer wird ein Reaktionspartner an eine feste Phase gebunden. Außerdem werden freie Reaktionspartner, die der festen Phase zugegeben wurden, durch einfache Waschschriffe entfernt und die Auswertung des Testes beruht immer auf einer Farbreaktion (VOLLER et al., 1978). Das Grundprinzip basiert auf einem Enzym, welches an einen der Reaktionspartner gebunden wird und nach Zugabe eines Substrates in eine quantifizierbare Farbreaktion mündet (MIURA et al., 2008; O'BEIRNE und COOPER, 1979).

Die drei Hauptgruppen des ELISA sind der direkte, der indirekte und der Sandwich ELISA. Im Falle des direkten ELISA wird ein Antigen während einer Inkubationsphase an eine feste Phase gebunden, z.B. eine Mikrotiterplatte aus Kunststoff. Nichtgebundenes Antigen wird anschließend durch Waschen entfernt. Der so beschichteten Platte werden nun dem Antigen entsprechende, in der Probe enthaltene, spezifische Antikörper zugegeben, an die in einer Vorinkubation ein Enzym gekoppelt worden ist. Nach erneuter Inkubationsphase mit jenen gekoppelten Antikörpern wird nichtgebundenes Material erneut durch einen Waschschriff entfernt. Im letzten Schritt wird nun ein Substrat hinzugefügt. Das gebundene Enzym dient nun als Katalysator einer Farbreaktion, die nach einer festgelegten Zeit durch Zugabe einer Stopplösung unterbunden wird und anschließend mittels Photometrie quantifiziert wird (CROWTHER, 2001; VOLLER et al., 1978). Abbildung 1 zeigt das Prinzip eines direkten ELISA nach Zugabe aller Reagenzien (Abb. 1).

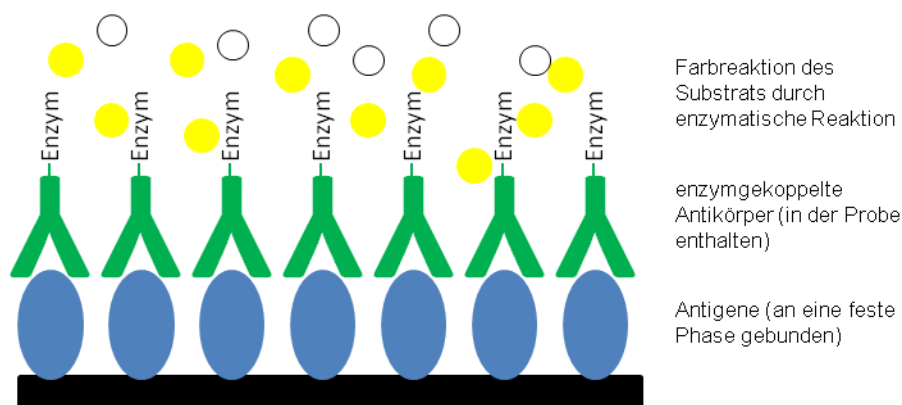


Abbildung 1: Grundprinzip eines direkten ELISA (eigene Darstellung)

Beim indirekten ELISA wird analog zum direkten zunächst ein Antigen an eine Platte beschichtet. Im Anschluss hieran werden Antikörper innerhalb einer Probe zugegeben, von denen nur die entsprechend zum Antigen passenden Antigen-Antikörper-Komplexe gebildet werden können. Überschüssige Antikörper werden in einem Waschschriff entfernt. Nun wird ein Sekundärantikörper, der mit einem Enzym gekoppelt ist, zugegeben. Nach erneutem Waschen folgt nun wie beim direkten ELISA die Zugabe von Substrat (CROWTHER, 2001; O'BEIRNE und COOPER, 1979). In nachfolgender Abbildung wird das Grundprinzip eines indirekten ELISA veranschaulicht (Abb. 2). Der indirekte ELISA bietet dabei den Vorteil, dass nicht ein spezifischer Antikörper zugegeben werden muss, sondern dass nur der passende Antikörper aus einer Probe bindet und dann mittels eines weiteren Sekundärantikörpers detektiert wird (CROWTHER, 2001; O'BEIRNE und COOPER, 1979; VOLLER et al., 1978). Der in der Arbeit als Referenztest Verwendung findende PIGTYPE® YOPSCREEN (QIAGEN Leipzig GmbH, Leipzig, Deutschland) folgt dem Prinzip eines indirekten ELISA. Er ist in Deutschland zum Nachweis von enteropathogenen Yersinien bei Schweinen zugelassen (FLI, 2013).

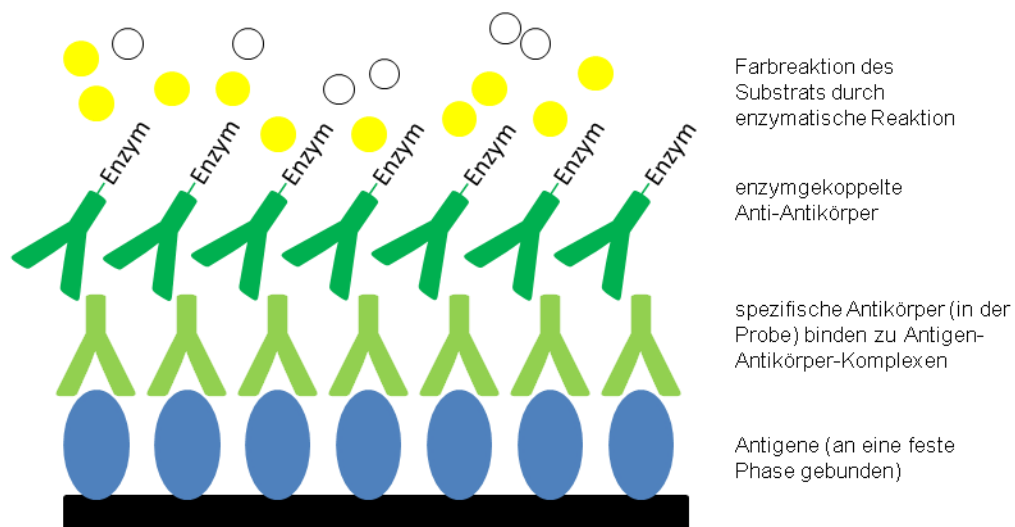


Abbildung 2: Grundprinzip eines indirekten ELISA (eigene Darstellung)

Eine weitere Variante des ELISA stellt der Sandwich ELISA. Alle drei Formen – direkter, indirekter und Sandwich ELISA – können auch als kompetitiver ELISA fungieren (VOLLER et al., 1978). Hierbei konkurrieren enzymmarkierte Antikörper und Probenantikörper um die Bindung am Antigen (CROWTHER, 2001; VOLLER et al., 1978).

3.3 BEADASSAY

Der Beadassay hat in den letzten Jahren an Bedeutung und Popularität in der medizinischen Forschung zugenommen (EARLEY et al., 2002; KELLAR und IANNONE, 2002). Er stellt ein schnelles, sensitives und spezifisches Testsystem dar und liefert zusätzlich durch das multiplexe Testformat die Möglichkeit, verschiedene Pathogene in nur einem Test nachzuweisen (DUNBAR et al., 2003). Die Eigenschaft des multiplexen Testformates, zusammen mit der Fähigkeit, eine hohe Zahl an Proben in Echtzeit auswerten zu können, macht den Beadassay zu einem einzigartigen Immunoassay (FULTON et al., 1997). Es konnte bereits gezeigt werden, dass der bead-basierte Immunoassay unter Umständen Vorteile im Vergleich zum ELISA hat. So bietet er eine schnellere Abarbeitung, stabilere Reagenzien, kleinere Probevolumina sowie eine höhere Sensitivität (BIAGINI et al., 2004).

Entwickelt in den späten 1970er Jahren, wurde der Fluoreszenzassay bereits in im nachfolgenden Jahrzehnt zum Gegenstand des wissenschaftlichen Interesses (SYRJALA et al., 1991; VIGNALI, 2000). Kurz nach dem ersten Einsatz zur Quantifizierung von Blutzellen konnte 1982 zum ersten Mal humanes IgG mittels eines fluoreszenzbasierten Immunosassays nachgewiesen werden (LISI et al., 1982; VIGNALI, 2000). Es folgten Beadassays zur Messung von Antikörpern gegen bakterielle und virale Erkrankungen, verursacht durch z.B. *Helicobacter pylori* und Hepatitis C (BEST et al., 1992; MCHUGH et al., 1997). Inzwischen wurden im Bereich der Humanmedizin diverse Beadassays entwickelt, u.a. zum Nachweis von Zytokinen, vielen weiteren bakteriellen und viralen Erkrankungen, Enzymen, Toxinen und von Nukleinsäuren (KEIJ und STEINKAMP, 1998; VIGNALI, 2000).

Grundlage der Beadtechnologie bilden mikroskopisch kleine sphärische Polyesterolpartikel, die sogenannten Beads. Diese dienen, analog zum ELISA, als Festphase für serologische Nachweisreaktionen. Mehrere Hersteller bieten weltweit ihre eigens produzierten Beads mit den passenden Analysesystemen an. Drei der meist verbreiteten kommerziellen multiplexen Testformate stammen von den Herstellern Becton Dickinson Immunocytometry Systems (BD), Diasorin sowie der Luminex Corporation (ELSHAL und MCCOY, 2006). Die Beads des Luminex xMAP® Systems, früher FlowMetrix™ System genannt, werden mit verschiedenen Abstufungen von zwei unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt (ELSHAL

und MCCOY, 2006; VIGNALI, 2000). Dies ermöglicht eine große Anzahl von jeweiligen Farbkombinationen bzw. unterschiedlichen Beads (ELSHAL und MCCOY, 2006; VIGNALI, 2000). Damit wird die Grundlage zur Entwicklung von multiplexen Testformaten gebildet (FULTON et al., 1997). Zur Messung der Tests wird allerdings die spezielle Hardware mit dem Lasersystem der Firma Luminex benötigt (KETTMAN et al., 1998). Der Cyometric Bead Assay von BD basiert auf unterschiedlichen Abstufungen von nur einer Fluoreszenzfarbe. Dies hat den Nachteil, dass die Anzahl an Tests limitiert ist. Allerdings bietet der Cytometric Bead Assay den Vorteil, dass jeder Test in einem normalen Durchflusszytometer mit einem Laser bei 488 nm Wellenlänge analysiert werden kann (ELSHAL und MCCOY, 2006; FULTON et al., 1997). Eine weitere Möglichkeit zum Einsatz von Beads nutzt der Hersteller Diasorin aus. Diese Beadtechnologie arbeitet nicht durch Fluoreszenz, sondern nutzt die unterschiedliche Lichtstreuung von verschieden großen Latex-Mikrosphären. Allerdings steht dieses System in Bezug auf den Einsatz mit multiplexen Testformaten und auch im Hinblick auf die Sensitivität hinter den fluoreszenzbasierenden Systemen zurück und konnte sich daher noch nicht allgemein durchsetzen (ELSHAL und MCCOY, 2006). Seit ca. einem Jahrzehnt spielt eine weitere Art von Beads eine zunehmende Rolle in Medizin und Forschung, die ebenfalls ohne den Einsatz von Fluoreszenzfarbstoffen arbeitet. Es handelt sich dabei um magnetische Beads. Inwieweit sich diese gegen fluoreszenzbasierte Beadassays durchsetzen, darüber wird erst in den kommenden Jahren ein Résumé gezogen werden können (CIOCCHINI et al., 2013).

3.3.1 Die Luminex xMAP® Technologie

Die Entwicklung des in dieser Arbeit beschriebenen Beadassays, dem *recomBead* Yersinia pig, erfolgt mit den Beads und dem Analysesystem der Luminex xMAP® Technologie. Aus diesem Grund wird nun die Technologie jenes Herstellers beispielhaft beschrieben.

3.3.1.1 Beads

Das Luminex xMAP[®] System ist in der Lage, 5,5 µm große, uniforme Polyesterolkügelchen, die sogenannten Beads, anhand einer digitalen Signalverarbeitung zu klassifizieren (ELSHAL und MCCOY, 2006; FULTON et al., 1997; KETTMAN et al., 1998). Diese Klassifizierung basiert auf der Färbung der Mikrosphären mit roten und infraroten Fluoreszenzfarbstoffen zu je unterschiedlichen Anteilen (ELSHAL und MCCOY, 2006; FULTON et al., 1997). Im Fall der Luminex xMAP[®] Technologie kommen jeweils zehn verschiedene Konzentrationsstufen beider Fluorophore zum Einsatz. Insgesamt stehen damit einhundert verschiedene Mikrosphären-Typen zur Verfügung (ELSHAL und MCCOY, 2006; VIGNALI, 2000). Jeder Fluoreszenzintensität ist einer definierten Population von Mikrosphären, einer sogenannten Beadregion, zugeordnet. Durch die verschiedenen Fluoreszenzintensitäten erhält jede Beadregion eine eigene Morphologie und damit eine spektral unterscheidbare Schattierung, die in den entsprechenden Bereichen des optischen Spektrums Licht emittiert (ELSHAL und MCCOY, 2006; PROGEN BIOTECHNIK, 2012; VIGNALI, 2000). Abbildung 3 veranschaulicht die Kombinationsmöglichkeiten der je zehn unterschiedlichen Konzentrationsstufen der beiden Fluoreszenzfärbungen (Abb. 3).

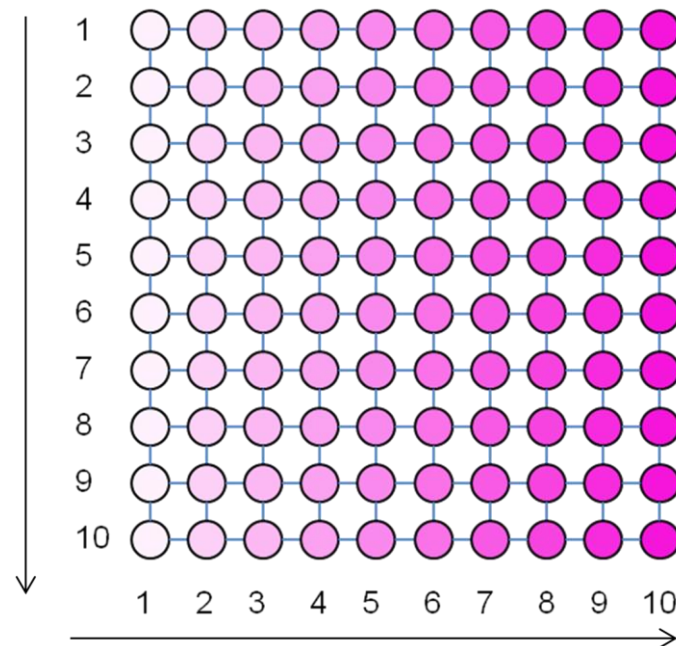


Abbildung 3: Kombinationsmöglichkeiten der je zehn unterschiedlichen Konzentrationsstufen der beiden Fluoreszenzfärbungen (rot und infrarot) (PROGEN BIOTECHNIK, 2012)

3.3.1.2 Multiplexität

Die Beadtechnologie zeichnet sich besonders durch ihre Fähigkeit zur Multiplexität aus (FULTON et al., 1997). Durch die Vielzahl an unterschiedlichen Mikrosphären wird ein simultaner Nachweis von bis zu einhundert verschiedenen Parametern in einem sehr geringen Probenvolumen ermöglicht. Man erhält dadurch ein multiplexes Testformat, bei welchem jede Beadregion innerhalb des Testformates einen definierten Einzeltest darstellt (KEIJ und STEINKAMP, 1998; MORGAN et al., 2004; VAN EMON, 2007). Dadurch besteht die Möglichkeit, mehrere Testformate innerhalb eines Tests vorzunehmen, beispielsweise der getrennte Nachweis von *Campylobacter* spp. und *Yersinia* spp. innerhalb eines Testsystems. Beinhaltet ein Testsystem allerdings zu viele Reaktionspartner, kann es durch Kreuzreaktivität zu Problemen in der korrekten Auswertung kommen (VIGNALI, 2000). Bei welcher Anzahl von Analyten dieser Fall eintreten kann, hängt von deren Zusammensetzung ab und kann daher nicht standardisiert werden, sondern ist im Einzelfall zu prüfen (ELSHAL und MCCOY, 2006). Zwei funktionierende uniplexe Beadassays können also nicht immer problemlos zu einem multiplexen Testformat vereinigt werden (ELSHAL und MCCOY, 2006; MORGAN et al., 2004).

3.3.1.3 Beschichtungsmöglichkeiten

Die Mikrosphären können mit vielen verschiedenen Biomolekülen beschichtet werden. Zur Verfügung stehen z.B. Kopplungen mit Antigenen, Antikörpern, Enzymen oder Nukleinsäuren (KEIJ und STEINKAMP, 1998; KETTMAN et al., 1998; SYRJALA et al., 1991; VIGNALI, 2000). Deren Auswahl beruht auf der jeweilig gewünschten Nachweisreaktion. In der humanmedizinischen Forschung konnten dadurch bis heute eine Vielzahl von Testsystemen zum Nachweis von bakteriellen und viralen Erkrankungen sowie Autoimmunkrankheiten, wie z.B. Systemischer Lupus erythematosus oder akute Glomerulonephritis, entwickelt werden (MORGAN et al., 2004; SYRJALA et al., 1991; VIGNALI, 2000). Auch der Nachweis von Zytokinen, Toxinen, Wachstumsfaktoren, die Genotypisierung von DNA sowie hormonelle Analysen werden bereits regelmäßig durch Bead-basierte Immunoassays durchgeführt (ELSHAL und MCCOY, 2006; KEIJ und STEINKAMP, 1998; KELLAR und IANNONE, 2002; VIGNALI, 2000).

3.3.1.4 Kopplungsverfahren

Zur Beschichtung der Beads mit den gewünschten Biomolekülen stehen diverse etablierte Kopplungsverfahren zur Verfügung (FULTON et al., 1997). Welches Verfahren letztendlich Anwendung findet, hängt von der chemischen Beschaffenheit der Kopplungspartner ab. Beispielhaft erwähnt seien die Carboxylatbindung, Kopplung der Wahl bei Kopplungspartnern, welche Amin-Gruppen enthalten, sowie die Avidinkopplung bei biotinylierten Molekülen als Kopplungspartner (FULTON et al., 1997). Das in dieser Arbeit Verwendung findende Kopplungsverfahren mittels Carboxylatbindung wird im Methodenteil detailliert beschrieben.

3.3.1.5 Testabarbeitung

Die Basis eines jeden Tests bildet der sogenannte Beadmix, eine Mischung unterschiedlich gefärbter und beschichteter Bead-Populationen. Dieser muss vor Beginn der Testabarbeitung resuspendiert und anschließend in eine Mikrofilterplatte vorgelegt werden (SYRJALA et al., 1991). Durch Inkubation mit der Probe entsteht anschließend eine Bindung der beschichteten Mikrosphären mit dem jeweils molekular komplementären Reaktionspartner (Analyten), wobei die Menge an gebundenen Analyten umso höher ist, je höher die Konzentration des Analyten in der Probe ist (FULTON et al., 1997; SYRJALA et al., 1991). Nach Inkubation folgt ein mehrteiliger Waschschrift sowie im Anschluss die Zugabe von Sekundärantikörpern (SYRJALA et al., 1991). Dieses ist notwendig, um die Bindung des Analyten an die Mikrosphären nachzuweisen. Es handelt sich dabei i.d.R. um ein Detektormolekül, welches eine hohe spezifische Affinität zum Analyten besitzt und mit einem Fluoreszenzfarbstoff (z.B. Phycoerythrin) gekoppelt ist (PROGEN BIOTECHNIK, 2012; SYRJALA et al., 1991). Nach einem nochmaligen Waschschrift werden die Beads in Puffer resuspendiert und schließlich im Durchflusszytometer analysiert (SYRJALA et al., 1991). In nachfolgender Abbildung wird der Ablauf der Nachweisreaktion vereinfacht dargestellt (Abb. 4).

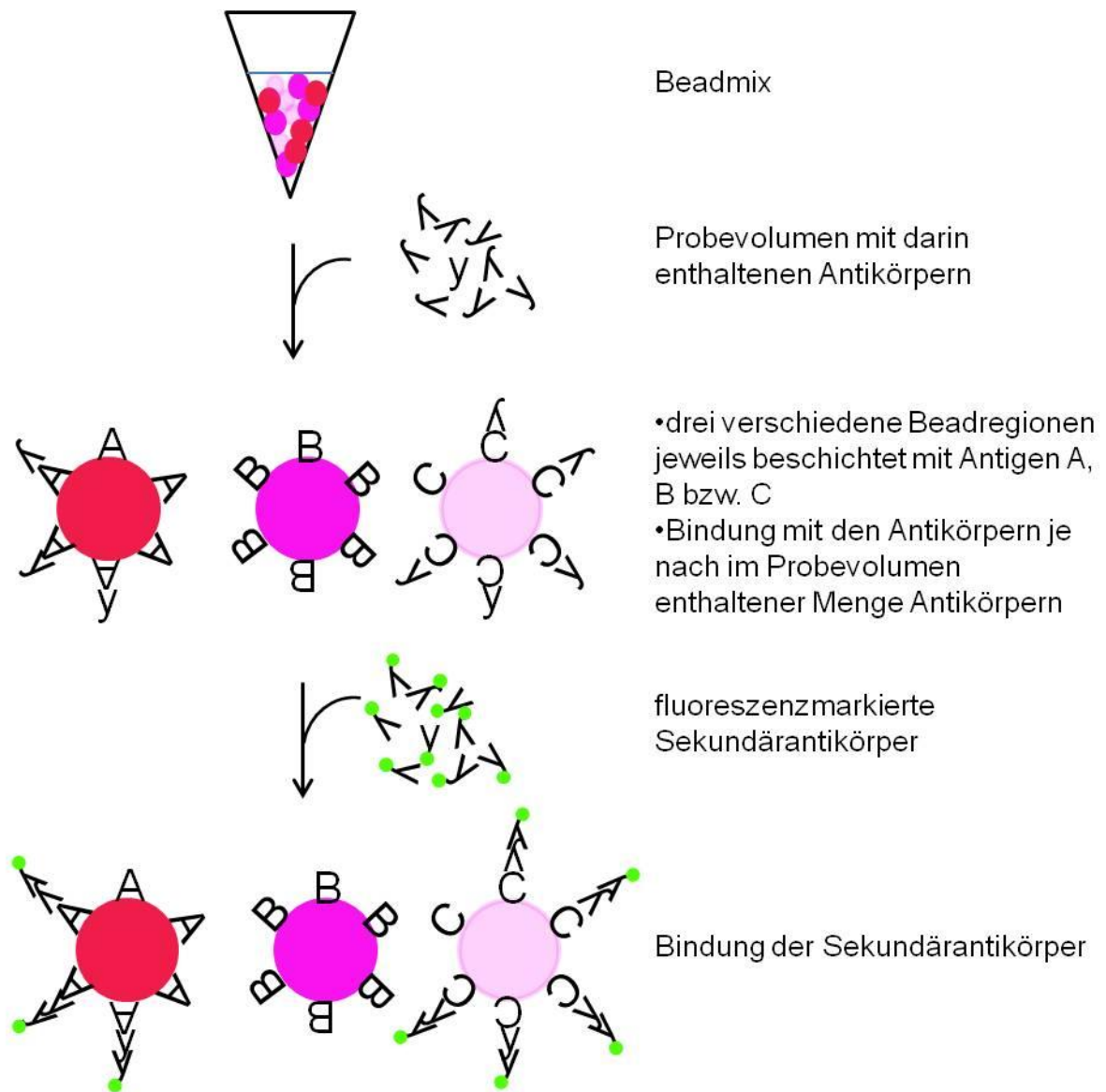


Abbildung 4: Ablauf der Nachweisreaktion mittels Beadassay (PROGEN BIOTECHNIK, 2012)

3.3.1.6 Analyse und Auswertung

Analyse und Auswertung erfolgen mit dem Luminex-Analysesystem auf Basis der Durchflusszytometrie unter Verwendung zweier unterschiedlicher Laser (ELSHAL und MCCOY, 2006; VIGNALI, 2000). Die Beads werden dazu vor der Messung durch Verlangsamung des Probendurchlaufs vereinzelt, um gezielt gemessen werden zu können (KEIJ und STEINKAMP, 1998; KETTMAN et al., 1998). Für die gleichzeitige Klassifizierung und Quantifizierung der Mikrosphären verfügt die Optik des Analysesystems über eine Laserdiode, die bei einer Wellenlänge von 633 nm Licht emittiert und damit die beiden inkorporierten Fluorophore anregt. Als Reaktion auf die Anregung emittiert einer der Farbstoffe Licht bei einer Wellenlänge von 645 nm bis 669 nm und der andere bei Wellenlängen über 712 nm. Die emittierte Strahlung der beiden Fluorophore wird anschließend analysiert und die Beads können ihrer Population zugeordnet werden (KELLAR und IANNONE, 2002; PROGEN BIOTECHNIK, 2012). Um die Verfälschung der Analyseergebnisse durch Beadagglutinationen und andere Verunreinigungen zu verhindern, wird das Licht der Laserdiode nicht nur zur Anregung der Fluorophore innerhalb der Mikrosphären, sondern auch zur Bestimmung der Partikelgröße genutzt. Dabei wird die Streustrahlung registriert, die die Mikrosphären beim Passieren der Laserstrahlen verursachen (KETTMAN et al., 1998).

Die Quantifizierung des Analyten erfolgt mittels eines Festkörperlaser, der bei einer Wellenlänge von 532 nm Licht emittiert. Dieser regt den grünen Fluoreszenzfarbstoff des Detektormoleküls an, wobei die Intensität des emittierten Lichts proportional zur gebundenen Analytenmenge ist (KELLAR und IANNONE, 2002; PROGEN BIOTECHNIK, 2012).

Durch den unterschiedlichen spektralen Bereich (Rot und Infrarot zu Grün) wird die gleichzeitige Klassifizierung der Mikrosphären zu der jeweiligen Beadregion sowie eine Quantifizierung des Analyten nebeneinander ermöglicht (ELSHAL und MCCOY, 2006; PROGEN BIOTECHNIK, 2012; VIGNALI, 2000). Abbildung 5 zeigt gleichzeitige Klassifizierung je nach Beadregion bzw. Analyt sowie die Quantifizierung der Analyten nach Fluoreszenzsignal in MFI (mittlere Fluoreszenzintensität) (Abb. 5).

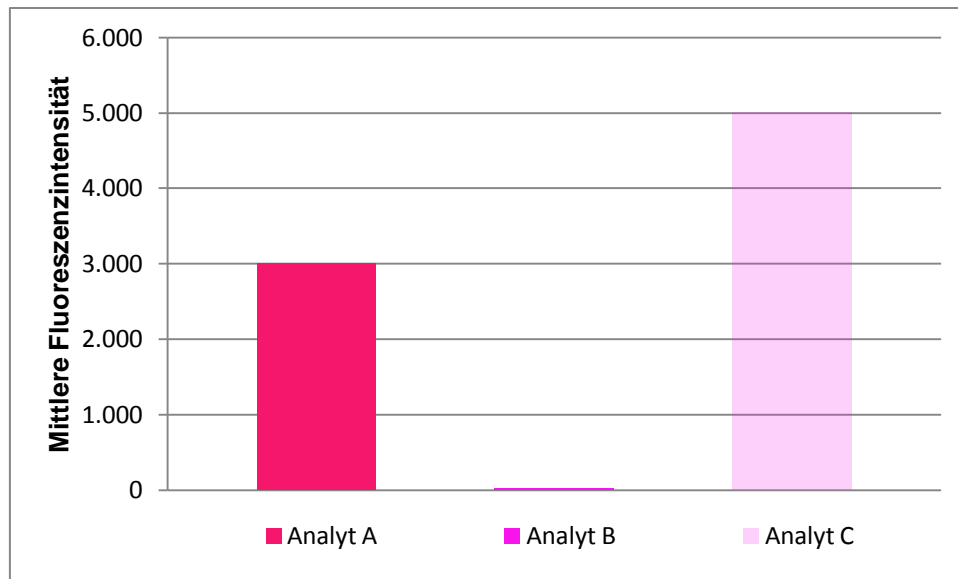


Abbildung 5: Exemplarische Klassifizierung je nach Beadregion bzw. Analyt sowie Quantifizierung der Analyten nach Fluoreszenzsignal in Mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) (PROGEN BIOTECHNIK, 2012)

Die Signale werden im Analysegerät digitalisiert und an den Signalprozessor geleitet, in dem die angefallenen Messwerte verstärkt und verarbeitet werden (FULTON et al., 1997; KETTMAN et al., 1998). Mit der Luminex 100IS 2.3- Software wird das System gesteuert (FULTON et al., 1997). Um eine Messung durchzuführen, müssen vom Anwender Templates und Batches kreiert werden, die dem Analysegerät die Testabarbeitung übermitteln. Im Template werden die generellen Messbedingungen für den jeweiligen Test festgelegt. Dabei wird dem System Folgendes übermittelt:

- die Beschichtung der Beadpopulationen
- das von der Sonde aufzunehmende Probenvolumen
- die Anzahl an Mikrosphären, die mindestens gemessen werden sollen
- die Einheit der Messgröße
- die maximale Analysezeit für eine Probe

Bei einem Batch handelt es sich lediglich um die Zuordnung der Proben zu den entsprechenden Wells. Dies ermöglicht einen schnelleren Überblick in der Auswertung. Das Programm bietet dabei einen permanenten Einblick in die Analyseabläufe (FULTON et al., 1997; KETTMAN et al., 1998). Die Ergebnisse

werden als Datenbericht im .csv-Format abgespeichert und mittels Excel ausgewertet (FULTON et al., 1997).

3.3.1.7 Kontrollen

Im Gegensatz zum ELISA werden beim Beadassay keine extra Wells für Positiv- und Negativkontrollen benötigt. Alle notwendigen Kontrollen werden jeweils zu einer eigenen Beadregion zugeordnet und werden damit automatisch bei jeder Messung pro Well mitgeführt. In der Regel sind dies eine Kontrolle zum Nachweis der Zugabe von und Inkubation mit Serum, genannt Inkubationskontrolle (IK), und eine Kontrolle pro fluoreszenzmarkiertem Detektormolekül einer Antikörperklasse, genannt Fluoreszenzkontrolle (FK). Alle Kontrollen müssen, pro Well, festgelegte Mindestfluoreszenzsignale erreichen. Andernfalls muss die Messung als ungültig deklariert werden (CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL INC, 2011). Die Mindestgrenzen werden dabei vom Hersteller selbst festgelegt und liegen bei der Firma Mikrogen (Neuried, Deutschland) bei mind. 6.000 MFI im Falle der IK und mind. 4.000 MFI für die FK.

3.3.1.8 Beschichtungsfehler und Möglichkeiten, diese zu beheben

Nicht selten kommt es während der Kopplung der Mikrosphären zu Problemen. Diese können so schwerwiegend sein, dass eine gesamte Kopplungscharge als unbrauchbar eingestuft werden muss. Deshalb wird im Falle der Firma Mikrogen jede hergestellte Kopplungscharge zunächst einzeln überprüft, bevor sie mit anderen Beadregionen zu einem Beadmix vermischt wird. Andernfalls bestünde das Risiko, dass ein gesamter Beadmix verworfen werden müsste, obwohl ein Großteil der darin enthaltenen Kopplungschargen fehlerfrei ist. Dies würde einen erheblichen zeitlichen und finanziellen Mehraufwand bedeuten. Mit der Überprüfung der einzelnen Kopplungschargen können diese ggf. auch einzeln erneut hergestellt werden. Jene Überprüfung erfolgt mittels eines sogenannten Testmixes. Dabei wird beim Hersteller Mikrogen nach der Kopplung zunächst ein kleines Volumen der hergestellten Kopplungscharge verdünnt und im Analysesystem ohne Zugabe von Serum oder Detektormolekül getestet (Leeranalyse). Sie erfolgt jeweils in vierfacher Ausführung.

Eine erste häufige Fehlerquelle ist die Agglutination von Beads untereinander. Diese führt zur mechanischen Verklumpung der Mikrosphären und macht eine Messung einzelner Beads unmöglich. Ein vom Anwender verursachter häufiger zweiter

Fehler ist das unbeabsichtigte Entfernen von Beads während der Waschschritte. Insbesondere bei dem immer wieder notwendigen Abziehen des Überstandes nach dem Zentrifugieren der Beads durch eine Pipette können diese leicht versehentlich entfernt werden. Falls es also zu jenen Agglutinationen oder einer verminderten Konzentration einer Beadregion gekommen ist, kann das Luminex-Analyse-System nur noch wenige Beads im Testmix finden. Dies führt zu einer deutlich längeren Messzeit als die üblichen 30-50 s jeder Probe, bis hin zum Abbruch der Messung nach den vom Template vorgeschriebenen 100 s. In beiden Fällen ist eine erneute Beschichtung der Kopplungscharge notwendig. Aufgetretene Agglutinationen macht das Analyse-System außerdem über ein Histogramm graphisch deutlich. Falls dies zu beobachten ist, sollte an andere Kopplungsbedingungen, z.B. Beschichtungskonzentration, pH-Wert oder Puffer, gedacht werden (CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL INC, 2011).

Um auszuschließen, dass der Testmix an sich fehlerhaft ist, sollte er bei jeder abweichenden Messung wiederholt werden. Liegen Messzeit und Counts bei einem wiederholt hergestellten Testmix innerhalb des Rahmens, so kann von einem Pipettierfehler während der Testmixherstellung ausgegangen werden. Findet das Analysesystem hingegen auch bei einem erneuten Testmix zu wenig Beads, kann von oben genannten Fehlern ausgegangen werden (CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL INC, 2011).

Ein weiterer Fehler lässt sich erkennen, wenn die Anzahl an Counts in allen vier Messungen eines Testmixes stark schwankt. Dies liegt in der Regel an schlecht aufgeschüttelten Beadregionen bzw. einem schlecht aufgeschüttelten Testmix. Er sollte wiederholt werden (CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL INC, 2011).

3.3.1.9 Vor- und Nachteile des Beadassays

Einmal gekoppelt, können verschiedene Beadregionen auf neue Art miteinander kombiniert werden. Dadurch bilden sie ein neues Testformat bei dem die Analyten dennoch im Anschluss getrennt ausgewertet werden können (VIGNALI, 2000). Diese Multiplexität ist einzigartig unter den Immunoassays (FULTON et al., 1997; VIGNALI, 2000).

Die Leistungsfähigkeit der Beadassays muss sich insbesondere mit den in der Routinediagnostik eingesetzten ELISA Testformaten messen lassen (ELSHAL und MCCOY, 2006; KELLAR und IANNONE, 2002; SYRJALA et al., 1991). Während in früheren Studien noch an der Sensitivität des Beadassays gezweifelt wurde, belegen neuere Studien klar, dass die Sensitivität des Beadassays i.d.R. ähnlich hoch ist wie im ELISA oder diese in manchen Fällen noch übertrifft (ELSHAL und MCCOY, 2006; KELLAR und IANNONE, 2002; SYRJALA et al., 1991; VIGNALI, 2000). Der Beadassay benötigt nur sehr kleine Probevolumina und ist auch dann noch anwendbar, wenn das Probevolumen zu klein für herkömmliche Immunoassays ist (KELLAR und IANNONE, 2002; MORGAN et al., 2004).

Aktuell ist die Zeitspanne von der Durchführung bis zur Auswertung der Ergebnisse vergleichbar mit der eines ELISA. Allerdings könnte sich dieses Verhältnis im Hinblick auf den Einsatz von multiplexen Testformaten sowie der Entwicklung von Beadassays ohne Waschschrte zugunsten des Beadassay ändern (ELSHAL und MCCOY, 2006; FULTON et al., 1997; MORGAN et al., 2004; VIGNALI, 2000). Im Hinblick auf ökonomische Faktoren liegt die Effizienz ähnlich wie bei anderen Immunoassays. Vorausgesetzt, das benötigte Equipment ist bereits im Labor vorhanden (KELLAR und IANNONE, 2002; SYRJALA et al., 1991).

III MATERIAL UND METHODEN

4 MATERIAL

4.1 SEREN UND FLEISCHTROPFSAFTPROBEN

Grundlage der Evaluierung des neuen Testsystems bildet ein Panel an 551 Serum- und 368 Fleischtropfsaftproben von Schlachtschweinen. Bereits vorliegend zu Versuchsbeginn waren 44 firmeninterne Seren der Firma Mikrogen (Neuried, Deutschland). Darunter 40 Seren, die im Vortest *Y. enterocolitica* positiv waren, eine definiert negative Probe eines gnotobiotischen Ferkels sowie drei Serumproben von Schweinen, aus deren Kot *Y. pseudotuberculosis* mittels PCR nachgewiesen wurde (Tab. 2). Diese lagerten in 2 ml Aliquots bei -20 °C im Tiefkühlschrank.

Zur Erhöhung der Probenanzahl fand die weitere Serumgewinnung an sechs separaten Probenahmeterminen im Zeitraum von Februar bis April 2012 in bayerischen Schlachthöfen statt. Die Anzahl der Proben belief sich auf je 49 bis 120 Blutproben, von denen im Anschluss Serum gewonnen wurde. Insgesamt wurden 551 Proben zu je 50 ml Blut in CELLSTAR® Tubes (Greiner Bio-One GmbH, Essen, Deutschland) aufgefangen (Tab. 2). Zeitpunkt der Entnahme war direkt nach dem Töten der Tiere.

An vier der oben genannten Probenahmen wurden zusätzlich jeweils zwischen 46 und 133, insgesamt 368, Muskelproben aus dem Zwerchfellpfeiler zur Gewinnung von Fleischtropfsaftproben genommen. Tabelle 2 zeigt die Auflistung aller verwendeten Seren und Fleischtropfsaftproben (Tab. 2).

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Seren und Muskelproben

Herkunft	Anzahl Serumproben	Anzahl Muskelproben
Firma Mikrogen	44 ¹	0
Schlachthof 1	49	46
Schlachthof 2	60	0
Schlachthof 3	79	0
Schlachthof 4	99	90
Schlachthof 5	100	99
Schlachthof 6	120	133
Gesamt	551	368

¹ 40 im Vortest *Y. enterocolitica* positive Seren, 3 Seren, bei denen die Schweine mittels PCR als *Y. pseudotuberculosis* positiv getestet wurden sowie das Serum eines negativen gnotobiotischen Ferkels

4.2 ANTIGENE

Die rekombinanten Antigene wurden in der hauseigenen Proteinchemie der Firma Mikrogen selbst hergestellt. Dabei erfolgte im ersten Schritt eine Klonierung des entsprechenden Antigens mit anschließender Aufreinigung. Die Proteine wurden zuletzt durch eine Dialyse in deren Lagerungspuffer umgepuffert. In Tabelle 3 werden die verwendeten Antigene inklusive ihrer biologischen Eigenschaften sowie die Zusammensetzung ihrer Lagerungspuffer dargelegt (Tab. 3). Es handelt sich dabei um YopD, YopE, YopH, YopM, YopN, MyfA, PsaA und VAG-A. Letzteres beschreibt das von Mikrogen so genannte Virulenzantigen A, welches dem Yop LcrV entspricht. Nachfolgende Tabelle zeigt die biologischen Eigenschaften und die Zusammensetzung des Lagerpuffers der verwendeten *Yersinia* spp. Antigene (Tab. 3).

Tabelle 3: Biologische Eigenschaften und Zusammensetzung des Lagerungspuffers der verwendeten *Yersinia* spp. Antigene

Antigen	Größe [kDa]	Proteinpuffer	pH-Wert	Proteinkonzentration	pI	Cysteine	Spezifität
YopD	35	20 mM MOPS, 8 M Urea	8,5	0,42 mg/ml	7,66	0	Yersinia Outer Protein
YopE	24	20 mM MOPS, 8 M Urea	6,2	0,22 mg/ml	7,5	3	Yersinia Outer Protein
YopH	52	50 mM MES, 160 mM NaCl, 8 M Urea	6,0	0,72 mg/ml	8,83	7	Yersinia Outer Protein
YopM	50	20 mM MES, 30 mM DTE, 30 mM NaCl, 8 M Urea	6,5	0,21 mg/ml	4,42	4	Yersinia Outer Protein
YopN	34	20 mM MES, 8 M Urea	6,0	0,95 mg/ml	5,91	1	Yersinia Outer Protein
MyfA	14,4	20 mM MES, 2 mM DTE, 50 mM NaCl, 8 M Urea	5,5	1,26 mg/ml	4,3	0	Adhäsine (spezifisch für <i>Y. enterocolitica</i>)
PsaA	14,7	20 mM MES, 8 M Urea	7,5	1,57 mg/ml	4,84	0	Adhäsine (spezifisch für <i>Y. pseudotuberculosis</i>)
VAG-A = LcrV	39,5	20 mM MOPS, Reinstwasser	6,5	0,38 mg/ml	6,15	1	Yersinia Virulenzantigen

pI = isoelektrischer Punkt

MES = 2-(N-Morpholino-)Ethansulfonsäure

MOPS = 3-(N-Morpholino-)Propansulfonsäure

4.3 INKUBATIONS- UND FLUORESZENZKONTROLLE

Neben den zuvor erwähnten Antigenen wurden zusätzlich zwei Antikörper an Beadregionen gekoppelt. Zum einen ein Ziege-Anti-Schwein-IgG-Antikörper (Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland). Dieser Sekundärantikörper bindet an in Serum bzw. FTS vorhandene unspezifische IgG-Antikörper. Da jedes Tier im Laufe seines Lebens gegen diverse Antigene IgG-Antikörper ausbildet, war daher auch stets ein positives Signal im Test zu erwarten (CURTIS und BOURNE, 1971; TIZARD, 2004). Im Testsystem wurde dieser Sekundärantikörper daher eingesetzt, um die Zugabe von Serum bzw. FTS zu jedem einzelnen Well zu bestätigen. Er wurde deshalb Serumkontrolle oder auch Inkubationskontrolle (IK) genannt, da ein positives Signal erst nach erfolgreicher Inkubation messbar war.

Auch der zweite Antikörper diente als Kontrollparameter. In diesem Fall sollte die Sicherstellung des Detektormoleküls gewährleistet werden. Dies wurde mittels Ziege-Anti-R-Phycoerythrin (Rockland Inc., Gilbertsville, Pennsylvania, U.S.A.) bewirkt, an welches das an das Detektormolekül gekoppelte R-Phycoerythrin bindet und dadurch zum messbaren Fluoreszenzsignal führt. Benannt wurde die mit diesem Antikörper beschichtete Beadregion als Fluoreszenzkontrolle (FK). In Tabelle 4 sind die Zusammensetzung sowie der Hersteller und Artikelnummer der verwendeten Antikörper ersichtlich (Tab. 4).

Tabelle 4: Zusammensetzung und Hersteller der verwendeten Antikörper

Antikörper	Zusammensetzung	Hersteller	Artikelnummer
Serumkontrolle IgG (IK) =Sekundärantikörper	Ziege-Anti-Schwein IgG (H+L), unkonjugiert,	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	114-005-003
Fluoreszenzkontrolle (FK) =Primärantikörper/ Epitop Tag	Ziege-Anti-R- Phycoerythrin	Rockland Inc., Gilbertsville, Pennsylvania, U.S.A.	600-101-387

4.4 DETEKTORMOLEKÜLE

Im zu entwickelnden Beadassay fanden verschiedene Detektormoleküle Anwendung. Unter ihnen sowohl Sekundärantikörper als auch Konjugate. Zum einen Anti-Schwein-IgG, welches mit Biotin konjugiert vorlag. Zum anderen drei an R-Phycoerythrin konjugierte Streptavidinkonjugate, allerdings von unterschiedlichen Herstellern. Zudem kam Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin zum Einsatz. Die verwendeten Detektormoleküle wurden direkt vom Hersteller bezogen und sind in nachfolgender Tabelle bezüglich ihrer Zusammensetzung, der Bezugsquelle und deren Artikelnummer dargelegt (Tab. 5).

Tabelle 5: Zusammensetzung, Bezugsquelle und Artikelnummer der verwendeten Detektormoleküle

Detektormoleküle	Zusammensetzung	Hersteller	Artikelnummer
Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin =Sekundärantikörper	Ziege-Anti-Schwein IgG (H+L), konjugiert an Biotin	Dianova GmbH, Hamburg, Deutschland	114-065-003
Streptavidin mit R- Phycoerythrin =Konjugat	R-Phycoerythrin konjugiert an Streptavidin	Prozyme, Hayward, Kalifornien, U.S.A.	PJ31S
Streptavidin mit R- Phycoerythrin =Konjugat	R-Phycoerythrin konjugiert an Streptavidin	Invitrogen, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland	S-866
Streptavidin mit R- Phycoerythrin =Konjugat	R-Phycoerythrin konjugiert an Streptavidin	Moss, Pasadena, Maryland, U.S.A.	SAPE-001
Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R- Phycoerythrin =Sekundärantikörper	Ziege-Anti-Schwein IgG (H+L), konjugiert an R-Phycoerythrin	Moss, Pasadena, Maryland, U.S.A.	PIGG-001

4.5 CHEMIKALIEN

- Bovines Serumalbumin (BSA), Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, Artikelnummer 11920.06
- Di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer 119753
- N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimid-Hydrochlorid (EDC), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Artikelnummer E6383
- Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, Artikelnummer 11278
- Harnstoff (Urea), Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer 3941.1
- Isopropanol, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer 20922.466
- LiquiChip, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, Artikelnummer 922902
- 2-(N-Morpholino)Ethansulfonsäure (MES), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Artikelnummer M3671
- 2-Methyl-4-isothiazolin-3-one Hydrochlorid (MIT-HCl), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Artikelnummer M6045
- Natriumchlorid (NaCl), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer 106406
- Natriumhypochlorit (NaOCl), Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland, Artikelnummer 105614
- Oxypyrron, Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland, Artikelnummer 11374559103
- N-Hydroxysulfosuccinimid (NHS), Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland, Artikelnummer 56485
- 2-Amino-2-(Hydroxymethyl)-propan-1,3-diol (Tris), Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland, Artikelnummer 4855
- Polyoxyethylen(20)sorbitan-monolaurat (Tween), Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland, Artikelnummer 37470
- Stabilguard® Immunoassay Stabilizer, SurModics Inc., Eden Prairie, Minnesota, USA, Artikelnummer SG01-0050

4.6 PUFFER

Während der Entwicklung des Testformates wurden diverse Puffer benötigt. So kamen zum Beschichten der Mikrosphären in nacheinander folgenden Arbeitsschritten Aktivierungs-, MES-Kopplungs- bzw. MES-Kopplungspuffer mit Urea, Blockierungs- und Lagerungspuffer zum Einsatz. Zur Verdünnung von Serum und FTS wurde außerdem Serumverdünnungspuffer (SVP) benötigt. Alle verwendeten Puffer wurden in der Firma Mikrogen selbst hergestellt. In Tabelle 6 wird die Zusammensetzung der benötigten Puffer beschrieben (Tab. 6).

Tabelle 6: Zusammensetzung der hergestellten und verwendeten Puffer in alphabetischer Reihenfolge

Puffer	Zusammensetzung
Aktivierungspuffer	0,1 M Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O, pH 6,3
Blockierungspuffer	0,1 M Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,8
Lagerungspuffer	0,05 % Tween, 0,1 % Oxypyrion, 0,01 % MIT-HCL, 0,15 M NaCl, 0,02 M EDTA, 1 % BSA, 0,05 M Tris, pH 7,8
MES-Kopplungspuffer	0,05 M MES, 0,15 M NaCl, pH 5,0
MES-Kopplungspuffer mit Urea	0,05 M MES, 0,15 M NaCl, 8 M Urea, pH 5,0
Serumverdünnungspuffer (SVP)	2,5 M NaCl, 100 mM Tris, 0,05 % MIT, pH 7,82, 0,5 % Oxypyrion, 0,25 % Tween

4.7 LÖSUNGEN

In Tabelle 7 sind die für die vorliegende Arbeit hergestellten EDC-, NHS- und Natriumhypochloritlösungen aufgelistet (Tab. 7).

Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Lösung	Zusammensetzung
EDC-Lösung	5 mg/100 µl Aktivierungspuffer
Natriumhypochloritlösung	13 %ig in Reinstwasser
NHS-Lösung	5 mg/100 µl Aktivierungspuffer

4.8 VERBRAUCHSMATERIALIEN

- Beadpopulationen 151, 152, 108, 117, 128, 116, 132, 131, 150; Luminex Corporation, Austin, Texas, U.S.A
- CELLSTAR® Tubes, 15 ml, 50 ml, PP; Greiner Bio-One GmbH, Essen, Deutschland, Bezug über VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland Artikelnummern 82050-276, 82050-346
- Filterplatten Multiscreen HTS™, BV; Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, U.S.A., Artikelnummer, MSBVS1210
- Kunststoffbeutel, Firma neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland, Artikelnummer 1-7104
- MASTERBLOCK® (1,5 ml Mikrofilterplatte), Greiner Bio-One GmbH, Essen, Deutschland, Artikelnummer 780261
- Mikro-Schraubröhrchen, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml, PP; Sarstedt Aktiengesellschaft, Nümbrecht, Deutschland, Artikelnummern 72.730.003, 72.703, 72.609
- Mikrozentrifugenröhrchen, Simport, Beloeil, Kanada, Artikelnummer T330-7LST
- Reagiergefäße, 1,5 ml; Sarstedt Aktiengesellschaft, Nümbrecht, Deutschland, Artikelnummer 72.706
- Schraubverschlüsse, Sarstedt Aktiengesellschaft, Nümbrecht, Deutschland, Artikelnummern 65.716.001, 65.716.002, 65.716.003, 65.716.005, 65.716.006, 65.716.008, 65.716.022
- Untersuchungshandschuhe Safe Skin, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland, Artikelnummer 1-8107

4.9 GERÄTE

- Achtkanalpipette 20-300 µl, Mettler-Toledo GmbH, Giessen, Deutschland
- DURAN® Flaschen, 50ml, 100 ml, 250 ml, 500 ml, 1000 ml; neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Artikelnummern E-2056, E-2057, E-2058, E-2059, E-2060
- Heraeus® Brutschrank Function Line, 470W, B12, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, U.S.A.
- Kolbenhubpipetten 0,5-2 µl, 2-20 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl; Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
- Kühlschrank profi line, Firma Liebherr, Kirchdorf an der Iller, Deutschland
- Laborwaage BP3100S, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
- Mikrofilterplattenschüttler Titramax 100, Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
- Plastik-Messzylinder 50 ml, 100 ml; neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Artikelnummern E-4035, E-4036
- Rotator RM-211, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland, Artikelnummer 7-0045
- Saugstation für Multititerplatten, Qiagen, Hilden, Deutschland
- Tiefkälteschrank 2-16K MDF-U70V, Sanyo, Moriguchi, Japan
- Tischkühlzentrifuge Sigma 1-14 K, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
- Tischzentrifuge C1301B-230V, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Ultraschallgerät Emmi5-Reiniger, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland
- Vakuumpumpe, BVC 21, 1,9 m³/h; Vacuubrand GmbH & Co KG, Wertheim, Deutschland
- Vortex-Genie 2, G 560E, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland

4.10 REFERENZMETHODE

Als Referenzmethode diente der kommerziell erhältliche ELISA PIGTYPE® YOPSCREEN der Firma QIAGEN Leipzig GmbH, Leipzig, Deutschland. Alle im Beadassay getesteten Serum- und Fleischtropfsaftproben wurden im ELISA gegengetestet.

5 METHODEN

5.1 PROBENAUFBEREITUNG

Die Vollblutproben wurden direkt nach Entnahme gekühlt und ruhten über Nacht bei 6 °C im Kühlschrank. Am nächsten Tag wurde der Blutkuchen vom Serum durch Zentrifugation (Tischkühlzentrifuge Sigma 1-14 K, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland) für je 10 min bei 4 °C unter maximaler Umdrehung (14.800 Umdrehungen pro min) getrennt. Anschließend wurde das Serum in 2 ml Mikroschraubröhrchen (Sarstedt Aktiengesellschaft, Nümbrecht, Deutschland) aliquotiert und umgehend bei -20° C bis zum Gebrauch tiefgefroren.

Für die Gewinnung des Fleischtropfsaftes (FTS) wurde pro zu beprobendem Tier ein ca. 3 x 3 x 3 cm großes Muskelstück – frei von Fett und Bindegewebe – aus dem Zwerchfellpfeiler entnommen und in sterile Kunststoffbeutel (Firma neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg, Deutschland) verpackt. Während der Entnahme wurden Messer und Hände regelmäßig mit Heißwasser gereinigt. Sämtliche Proben der Muskulatur wurden im Rahmen der Fleischtropfsaftgewinnung maximal 2 h nach Entnahme für mind. 24 h bei -20 °C tiefgefroren. Der beim Auftauen bei Raumtemperatur entstandene FTS wurde zu je zwei Aliquots in 1,5 ml Mikroschraubröhrchen (Sarstedt Aktiengesellschaft, Nümbrecht, Deutschland) abpipettiert und tiefgefroren. Die dabei gewonnene Menge an FTS variierte je nach Probe zwischen 0,3 und 2,0 ml. Jedes Aliquot wurde im Rahmen der Versuche nur einmal aufgetaut und danach verworfen.

5.2 HERSTELLUNG DES BEADASSAYS

5.2.1 Verwendete Antigene

Bei den zur Verfügung stehenden Antigenen handelte es sich um von der Firma Mikrogen hergestellte hochgereinigte rekombinante Antigene von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*. Im recomBead Yersinia human fanden derzeit die Antigene YopD, YopE, YopM, MyfA, PsaA sowie VAG-A, welches LcrV entspricht, Verwendung. Zu Evaluierung des veterinärmedizinischen Testformates wurden allerdings die zwei zudem vorhandenen Antigene YopH und YopN zusätzlich mit einbezogen. Diese hatten sich im humanmedizinischen Testformat in internen Testreihen der Firma Mikrogen als unspezifisch heraus gestellt.

5.2.2 Kopplung der Antigene

Für die Kopplung von Antigenen an Mikrosphären standen verschiedene etablierte biochemische Verfahren zur Verfügung. Im Falle des hier beschriebenen Beadassays wurde sich an das bei Mikrogen festgelegte Kopplungsprinzip gehalten. Im Folgenden wird dieses inklusive der einzelnen Reaktionsschritte näher erläutert. Im Vorfeld der Kopplung wurde die entsprechende Beadregion je Antigen festgesetzt. Dabei trugen die von Luminex hergestellten Beads eine Nummerierung von 001 bis 100, wobei die Auswahl der Beadregion zum entsprechenden Antigen dabei dem Entwickler des Testsystems überlassen bleibt. Allerdings musste jedes Antigen auf eine eigene Region festgelegt werden, um dem auswertenden Gerät eine Zuordnung zu ermöglichen.

Bei der Beschichtungskonzentration wurde sich an die im *recomBead* Yersinia human evaluierten optimalen Werte gehalten. Lediglich für YopH und YopN mussten diese durch den Einsatz von mehreren verschiedenen Beschichtungskonzentrationen getestet werden. Die meisten Antigene lagen im Vorfeld in harnstoffhaltigem Verdünnungspuffer vor. Dies war notwendig, um die Antigene daran zu hindern, miteinander zu aggregieren. Aufgrund dessen wurde ebenfalls während der Kopplungsphase harnstoffhaltiger Puffer benötigt. Tabelle 8 führt die verwendeten Antigene mit ihrer entsprechenden Beadregion, der Beschichtungsstärke sowie ihrem Kopplungspuffer auf (Tab.8).

Tabelle 8: Beschichtungsinformationen der verwendeten Antigene

Antigen	Beadregion	Beschichtungs- stärke	harnstoffhaltiger Kopplungspuffer
YopD	108	10,5 ng/µl	ja
YopE	117	50 ng/µl	ja
YopH	125	10 ng/µl	ja
YopM	116	50 ng/µl	ja
YopN	126	30 ng/µl	ja
MyfA	132	50 ng/µl	ja
PsaA	131	25 ng/µl	ja
VAG-A	150	50 ng/µl	nein

5.2.2.1 Aktivierung der Beads

Den ersten Schritt des Kopplungsprozesses bildete die Aktivierung der Beads. Zunächst wurde das benötigte Volumen der Beads, die vom Hersteller Luminex in deren Puffer vorlagen, in ein Simport Gefäß (Simport, Beloeil, Kanada) umpipettiert. Diese weisen, im Gegensatz zu anderen Mikrozentrifugenröhrchen, eine ebenmäßigere Beschichtung auf, die notwendig war, um das Anlagern der Beads an der Wand des Gefäßes zu verhindern. Die entnommene Menge an Beadlösung bezeichnet man als Kopplungschargen-Größe. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde meist mit einem Volumen von 50 µl gearbeitet. Folgende Mengen beziehen sich deshalb auf diese Menge.

Um die Beads vom Puffer zu trennen, wurde die Lösung zunächst zentrifugiert (Tischkühlzentrifuge Sigma 1-14 K, Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz), um die enthaltenen Beads zu einem Pellet zu formen. Überstehende Flüssigkeit wurde abpipettiert.

Das entstandene Pellet wurde in Aktivierungspuffer gelöst und es wurden zusätzlich definierte Mengen an EDC und NHS hinzugefügt. Ziel dessen war die Aktivierung der

an der Oberfläche der Beads befindlichen Carboxylgruppen. Dabei reagierte EDC mit den Carboxylgruppen zu einem instabilen o-Acylisourea-Aktivester, der bei Anwesenheit von NHS zu einem stabilen Sulfo-NHS-Aktivester umgewandelt wurde. An diesen konnten nun primäre Aminogruppen kovalent gebunden werden. Abbildung 6 zeigt schematisch die zwei nacheinander ablaufenden Reaktionsschritte der Aktivierungsphase (Abb. 6).

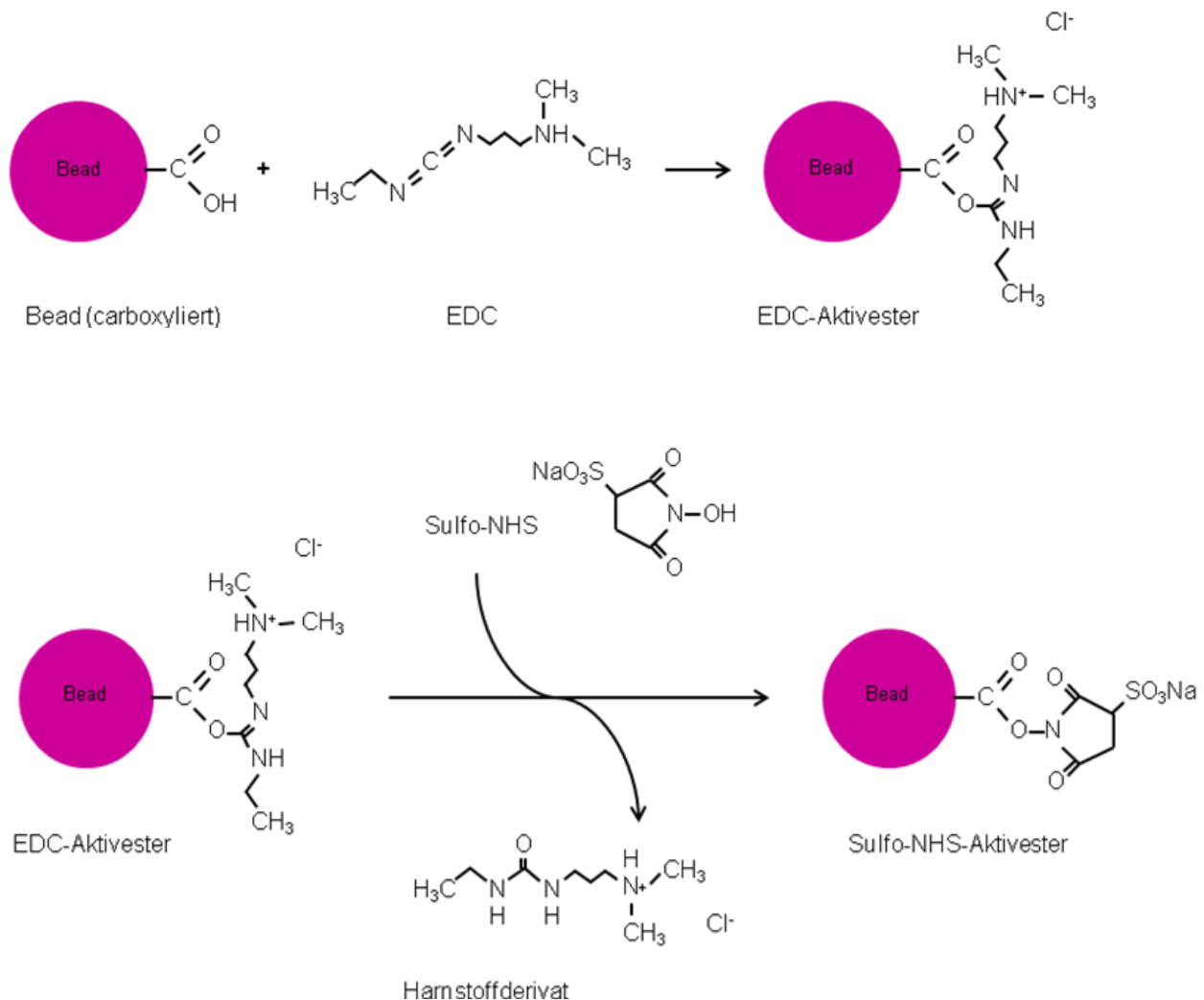


Abbildung 6: Schematische Darstellung der zwei nacheinander ablaufenden biochemischen Vorgänge während des Aktivierungsprozesses (Mikrogen, 2012, firmeninternes Manuskript)

Der Aktivierungsprozess erfolgte unter Lichtausschluss im Rotator (Rotator RM-211, neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg) für 20 min bei 35 rpm. Im Anschluss daran wurde die Lösung bei max. Umdrehung (14.800 Umdrehungen pro min) für 25 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das verbleibende Pellet mit Aktivierungspuffer gewaschen. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt.

Zur Vorbereitung der Kopplungsphase wurden die Pellets nun in dem für das jeweilige Antigen entsprechenden Kopplungspuffer gelöst.

5.2.2.2 Vorverdünnung der Antigene

Die bei -80 °C gelagerten Antigene befanden sich zur Stabilisierung der Haltbarkeit in hoch konzentrierter Lösung in einem MES-Urea-Puffer oder MES-Puffer. Der Vorteil dabei war die Sicherstellung der Haltbarkeit der Antigene. Allerdings hatte die hohe Konzentration der Antigene den Nachteil, dass es bei Beschichten der Mikrosphären mit zu hoher Konzentration zum Ausfällen der Proteine kam. Dadurch entstanden Agglutinationen der Beads. Wie bereits erwähnt, lagen die Beschichtungskonzentrationen der Antigene zwischen 10 und 50 ng/μl. Um dies zu gewährleisten, hätte man von der Antigenlösung Volumina von unter 0,01 μl zu den Beads zugeben müssen, was mit den vorhandenen Pipetten nicht in genauer Weise möglich gewesen wäre. Aus diesem Grund war eine Vorverdünnung der Antigenlösung notwendig. Sie erfolgte je nachdem, ob das Antigen in harnstoffhaltigem oder harnstofffreiem Puffer gelagert wurde, auch mit harnstoffhaltigem bzw. harnstofffreiem Kopplungspuffer. Pro 50 μl Kopplungschargengröße wurden 20 μl Antigenverdünnung nach folgend aufgeführter Berechnung hergestellt.

Zunächst wurde anhand der gewünschten Beschichtungskonzentration (BK) [ng/μl] und der vorliegenden Antigenkonzentration (c_{Antigen} in [ng/μl]) der Verdünnungsfaktor (Vf) errechnet.

$$Vf = \frac{c_{\text{Antigen}} \times 0,5}{Bk}$$

Dabei wurde die Konzentration der Stammlösung des Proteins mit dem Faktor 0,5 multipliziert, weil die vorverdünnte Proteinlösung durch das Zusammenbringen mit den Mikrosphären im Kopplungsschritt nochmal im Verhältnis 1:2 verdünnt wurde.

Anschließend wurde das benötigte Volumen an Antigen-Stammlösung in μl berechnet.

$$V_{\text{Antigen-Stammlsg.}} = \frac{V_{\text{verd. Antigenlsg.}} (= 20\mu\text{l})}{Vf}$$

Das Volumen des Kopplungspuffers, mit dem die Antigen-Stammlösung verdünnt wurde, wurde abschließend durch Subtraktion berechnet.

$$V_{\text{Kopplungspuffer}} = V_{\text{verd. Antigenlsg.}} (= 20\mu\text{l}) - V_{\text{Antigen-Stammlsg.}}$$

Das Mischen beider Flüssigkeiten erfolgte durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren und war eine Stunde vor dem Kopplungsschritt anzusetzen, um eine gleichmäßige Verteilung der Proteine innerhalb der Lösung sicher zu stellen.

5.2.2.3 Kovalente Kopplung der Antigene an die Mikrosphären

Nachdem die vorverdünnten Antigenlösungen eine Stunde bei Raumtemperatur geruht hatten, konnte der Kopplungsschritt gestartet werden. Zur Kopplung diente, je nach Antigen, harnstoffhaltiger Kopplungspuffer im Falle von Antigenen, die in harnstoffhaltigem Puffer gelagert werden bzw. harnstofffreier Kopplungspuffer bei Antigenen in harnstofffreiem Lagerungspuffer.

Die Beads wurden nach dem letzten Reinigungsschritt der Aktivierungsphase durch kurzes Vortexen (Vortex-Genie 2, G 560E, VWR International GmbH, Darmstadt) in 16 μl des jeweiligen Kopplungspuffers resuspendiert und mit 16 μl der dazugehörigen verdünnten Proteinlösung vermischt. Die Inkubation dieser Kopplungsansätze lief für zwei Stunden unter Lichtausschluss im Rotator ab. Abbildung 7 stellt schematisch den biochemischen Vorgang der Bindung des Proteins an die Mikrosphäre dar (Abb. 7). Hierbei reagiert der Sulfo-NHS-Aktivester mit der Aminogruppe des Antikörpers zum stabilen Amid.

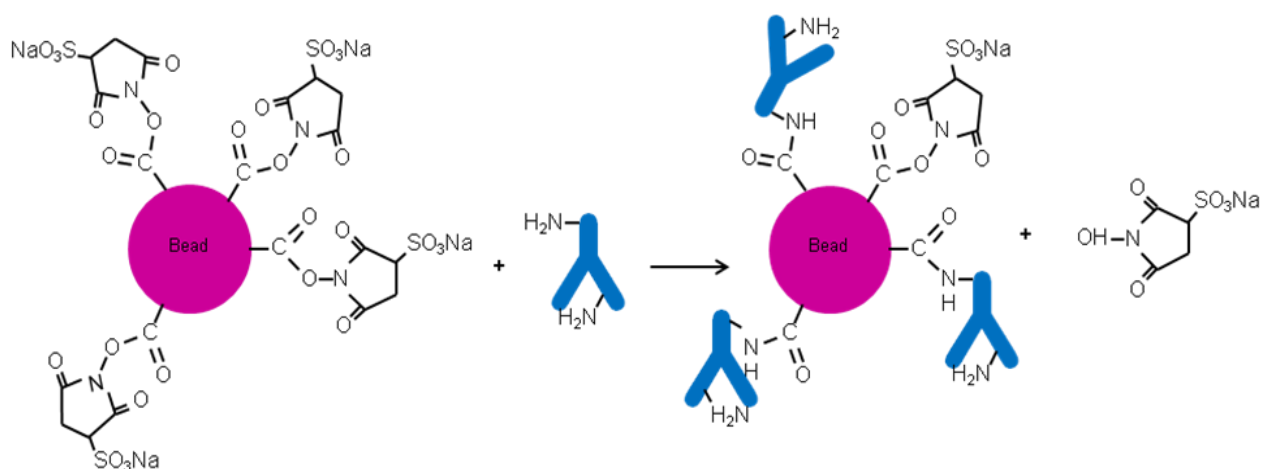


Abbildung 7: Biochemischer Vorgang der kovalenten Kopplung der Antigene an die Mikrosphären (Mikrogen, 2012, firmeninternes Manuskript)

Im Falle von Kopplungen, die in harnstoffhaltigem Kopplungspuffer stattfanden, war vor der nächsten Stufe des Prozessablaufs ein zusätzlicher Zwischenschritt notwendig. Da die Mikrosphären durch die 8M Ureaanteile in der Schwebe gehalten wurden, hätte sich während der anschließenden Zentrifugation kein Pellet bilden können. Die Trennung von Beads und dem überstehenden Puffer wäre damit nicht möglich gewesen. Um dies zu vermeiden, mussten die Kopplungsansätze vor erneuter Zentrifugation verdünnt werden. Nur so war die Harnstoffkonzentration gering genug, um die Mikrosphären während dem Zentrifugieren zu einem Pellet formen zu können. Die Verdünnung erfolgte mit 250 µl Kopplungspuffer ohne Harnstoff.

5.2.2.4 Blockierung der beschichteten Beads

Die abschließende Blockierung beendete den eigentlichen Kopplungsprozess und diente dazu, freie Sulfo-NHS-Aktivester-Gruppen mit Tris-Molekülen zu deaktivieren und freie Beadoberfläche mit BSA abzusättigen, damit sich keine Quervernetzungen zwischen den Mikrosphären bilden und keine störenden Substanzen binden konnten.

Nach der zweistündigen Inkubation (harnstofffreie Kopplungen) bzw. nach dem zusätzlichen Verdünnungsschritt (harnstoffhaltige Kopplungen) wurden die Ansätze 20 min zentrifugiert und der überstehende Kopplungspuffer wurde abpipettiert. Die beschichteten Beads wurden nun in 50 µl Blockierungspuffer resuspendiert und erneut zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Zuletzt wurden die Beads erneut in 50 µl Blockierungspuffer gelöst. Diese Blockierungsansätze wurden 30 min bei Lichtausschluss bei Raumtemperatur inkubiert. Abbildung 6 zeigt schematisch den biochemischen Ablauf der Blockierung der Mikrosphären mittels Tris-Molekülen (Abb. 6).

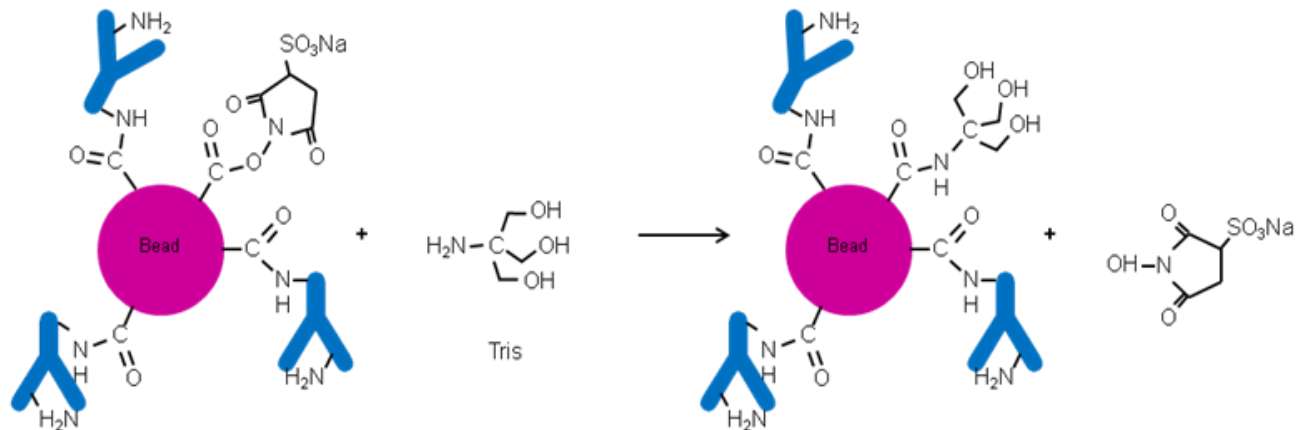


Abbildung 6: Biochemischer Prozess der Blockierung der beschichteten Mikrosphären mittels Tris-Molekülen (Mikrogen, 2012, firmeninternes Manuskript)

5.2.2.5 Überführen der beschichteten Beads in Lagerpuffer

Im Anschluss wurden die beschichteten Beads in Lagerpuffer, in welchem sie aufbewahrt werden sollten, überführt. Dazu wurde der Blockierungspuffer abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Im Anschluss wurde dreimalig jeweils mit 50 µl Lagerpuffer gewaschen und zuletzt in Lagerpuffer überführt. Das Volumen entsprach hierbei dem 6,4-fachen der Chargengröße. Die nun gekoppelten Beads wurden bei 6 °C bis zur Messung gelagert.

5.2.3 Kopplung der Inkubationskontrolle und der Fluoreszenzkontrolle

Abweichend zum *recomBead* Yersinia human handelte es sich bei dem zu koppelnden Protein der IK um gereinigtes Ziege-Anti-Schwein-IgG (Dianova GmbH). Die IK diente dazu, im Test sicher zu stellen, dass Serum bzw. FTS zum jeweiligen Well zugegeben wurde. Bei der FK handelte es sich um einen Ziege-Anti-R-Phycoerythrin-Antikörper (Rockland Inc.). Die FK wies nach, dass der Anwender das Detektormolekül zu dem entsprechenden Well zugegeben hatte. Die Kopplung von Antikörpern lief im Prinzip identisch wie die oben beschriebene Kopplung von harnstofffreien Antigenen ab.

Durch die Kombination der Fluoreszenzsignale der zwei Kontrollen konnten genaue Aussagen über die Anwesenheit von Serum und Detektormolekül getroffen werden. Damit würden Fehler bei der Anwendung des Testes ersichtlich gemacht.

5.2.4 Abschließende Überprüfung der beschichteten Beadpopulationen

Während der Kopplung kann es durch Fehler des Anwenders oder durch unerwünschte biochemische Reaktionen dazu kommen, dass qualitativ unterschiedliche Kopplungschargen entstehen. Zum einen besteht die Möglichkeit, bei einem oder mehreren der zahlreichen Waschschriffe unbeabsichtigt Beads zu entfernen. Zum anderen können während der Kopplung Agglutinationen der Beads untereinander entstehen. Zum Ausschluss dieser möglichen Fehlerquellen wurde vor Mischung der einzelnen Beadregionen miteinander, also der jeweiligen Kopplungschargen, grundsätzlich ein Testmix mit kleinem Volumen hergestellt.

5.2.4.1 Herstellung eines Testmixes

Bei einem Testmix wurden alle einzusetzenden Beadregionen in einer Verdünnung von 1:100 miteinander gemessen. Das Gesamtvolumen betrug dabei 500 µl, demnach betrug das Volumen einer Beadregion stets 5 µl. Die Differenz war mit Lagerpuffer auszugleichen.

$$V_{\text{Lagerpuffer}} = 500 \mu\text{l} - (\text{Anzahl der Beadregionen} \times 5 \mu\text{l})$$

Zur Herstellung des Testmixes wurde das erforderliche Volumen an Lagerpuffer in einem Eppendorf Gefäß vorgelegt und die einzelnen beschichteten Beadregionen zum Homogenisieren je 1 min gevortext. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 5 µl Beadlösung zum Lagerpuffer. Der fertige Testmix wurde ebenfalls 1 min gevortext.

Es erfolgte eine Vierfachbestimmung des Testmixes in vier Wells einer Mikrofilterplatte. Dazu wurden je 80 µl Mantelflüssigkeit (LiquiChip, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) vorgelegt, zu denen je 20 µl des Testmixes zugegeben wurden. Die Mantelflüssigkeit wird im Analysesystem für die Durchflusszytometrie benötigt. Eine Durchmischung erfolgte mittels Auf- und Abziehen durch die Pipette. Die Pipettenspitzen wurden nach jedem Well verworfen.

5.2.4.2 Messung des Testmixes

Vor der Messung wurde ein passendes Template erzeugt und ein Batch hinzugefügt. Das Template vermittelte der Software, welche Antigene gemessen werden sollten inklusive der entsprechenden Beadregion. Zudem wurde durch den Anwender das Probevolumen festgelegt, das pro Well vom Analysesystem aufzunehmen war. Auch

die Mindestzahl an zu messenden Beads pro Region sowie die maximale Analysezeit pro einzelner Well und Einheit, in der gemessen werden sollte, konnten vom Benutzer bestimmt werden. In Tabelle 9 wird das Template für den Testmix einer vollständigen Kopplung gezeigt (Tab. 9).

Tabelle 9: Template zur Messung eines Testmixes nach vollständiger Kopplung aller Beadregionen

Antigen	IK	FK	YopM	VAG-A	PsaA	YopD	MyfA	YopE	YopH	YopN
Bead-region	151	152	116	150	131	108	132	117	125	146
Aufzunehmendes Probevolumen						70 µl				
Minimal zu messende Beads pro Region						50				
Maximale Analysezeit pro Well						100 s				
Messeinheit						MFI				

Im Batch wurde der Software übermittelt, wie viele Wells einer Platte zu messen waren. Außerdem konnten die Proben je Well benannt werden, was eine erleichterte Auswertung zur Folge hatte.

Die Messeinheit MFI gab Auskunft über die Höhe der Fluoreszenzsignale der jeweiligen Beadregion. Neben der gefundenen Anzahl von Beads pro Region (den sogenannten Counts), die über die .csv Datei abrufbar waren, interessierte bei der Messung des Testmixes die Zeit, die das Analysegerät für jedes Well brauchte, um die minimale Anzahl von 50 Beads pro Region zu detektieren. Diese Zeit wurde für jedes Well notiert und später in das Formular zur Berechnung des Beadmixes eingefügt. Bei gelungenen Kopplungen dauerte die Messung für jedes Well circa 30-40 s.

5.2.5 Messung des Beadmixes

Beim Beadmix handelte es sich um die Mischung der einzelnen Beadregionen in Lagerpuffer zu einer Charge von größerem Volumen. Der fertige Beadmix bildete die Grundlage zum Einsatz im Testsystem mit Serum- oder Fleischtropfsaftverdünnung. Wünschenswert war grundsätzlich ein Beadmix, bei dessen Messung alle Beadregionen gleich lange analysiert werden mussten, um eine gleichmäßige Messung zu ermöglichen. Das heißt, im Idealfall wurden pro Region alle 50 Beads

gleich schnell detektiert. Außerdem sollte die gesamte Messzeit pro Well möglichst kurz sein, um dem Anwender einen schnellen Zugang zu Ergebnissen darzubieten. Kam es im Zuge der einzelnen Kopplungen jedoch zu Unterschieden in Reaktivität und Konzentration der Beads, mussten diese Unterschiede durch verschiedene Volumina der jeweiligen Lösung einer Beadregion ausgeglichen werden. Deren Berechnung erfolgte im Anschluss an den durchgeführten Testmix automatisch anhand dessen Daten in einem vorgefertigten firmeninternen Datenblatt der Firma Mikrogen. Benötigte Werte dabei waren die jeweils gemessenen Counts pro Antigen sowie die Laufzeiten je Durchlauf. Die berechneten Volumina der Beadregionen wurden anschließend zur ebenfalls berechneten Menge an Lagerpuffer zugegeben.

5.2.6 Überprüfung der gekoppelten Antigene auf ihre Reaktivität

Um die Effizienz der Kopplung zu überprüfen, wurde im Anschluss der erstellte Beadmix anhand eines humanen Prüfpanels getestet. Getestet wurden dabei definiert positive (Infektion gesichert) sowie definiert negative (Infektion ausgeschlossen) Seren. Die Austestung erfolgte mit Detektormolekülen des humanen IgG-Konjugates (Mikrogen). Da zum Zeitpunkt der Evaluierung noch keine gesichert negativen und positiven Kollektive an Schweineseren vorlagen, musste auf das humane Prüfpanel ausgewichen werden. Dementsprechend konnte im Vorversuch keine adäquate Aussage bezüglich YopN und YopH getroffen werden, da keine definierten Seren diesbezüglich vorlagen. Die Effizienz der IK wurde anhand einer Austestung mit Schweineseren und entsprechenden Detektormolekülen getestet. Da es sich hierbei nur um eine Ja-Nein-Frage handelte, wurden keine definierten Seren benötigt.

5.2.6.1 Serumverdünnung

Die Abarbeitung des Beadassays erfolgte nach dem Schema des *recomBead* Yersinia human. So wurden die Seren vor Ihrer Verwendung aufgetaut und in zwei Schritten im Verhältnis 1:200 mit Serumverdünnungspuffer (Mikrogen) verdünnt. Die Verdünnungen, Serumverdünnung 1 (SV1) und Serumverdünnung 2 (SV2) genannt, erfolgten in einem Masterblock. Für SV1 wurden 500 µl und für SV2 300 µl Serumverdünnungspuffer (SVP) in die Kavitäten des Masterblocks® (Greiner Bio-One GmbH, Essen, Deutschland) vorgelegt. Nach Zugabe von 10 µl der unverdünnten Probe zum Puffer der SV1 verweilte der Masterblock zum Durchmischen der Verdünnungen für 5 min auf dem Schüttler (Titramax 100,

Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland). Danach wurden 100 µl der SV1 in den vorgelegten Puffer für die SV2 überführt, die bei der Testdurchführung Verwendung fand.

5.2.6.2 Testdurchführung

Zuerst wurden die ungenutzten Kavitäten der Mikrofilterplatte mit Klebefolie versiegelt, die benötigten Kavitäten vor Gebrauch mit 50 µl SVP befeuchtet und nach 30 s über die Vakuumstation abgesaugt. Das nachfolgende Ausschlagen der Platte auf dem Tisch führte zum gewünschten Entfernen aller Flüssigkeitsrückstände unterhalb der Filtermembran. In jedes Well wurden nun 50 µl des mindestens 1 min gevortexten Beadmixes pipettiert und anschließend 50 µl der SV2 der zu untersuchenden Probe.

Die Mikrofilterplatte wurde mit einem Kunststoffdeckel abgedeckt und kam für 60 min zur Inkubation in den Wärmeschrank bei 37 °C. Die Platte wurde nun erneut auf der Vakuumstation abgesaugt. Anschließend wurde jedes Well dreimal mit 200 µl SVP gewaschen. Nach dem letzten Absaugen wurde die Platte nochmals auf dem Tisch ausgeschlagen. Nun wurde jeweils 50 µl der Lösung zupipettiert, die die sekundären Antikörper enthielt, und die Platte nochmals für 30 min im Wärmeschrank bei 37 °C inkubiert. Zuletzt wurde diese nun auf der Vakuumstation abgesaut, ausgeschlagen und es wurde je 100 µl Mantelflüssigkeit in jedes Well gegeben. Die Platte war bis zur Messung innerhalb von 30 min unter Lichtausschluss auf dem Schüttler aufzubewahren.

5.2.7 Kopplung und Überprüfung von drei Funktionsmustern

Um die Reproduzierbarkeit der Kopplungen zu überprüfen, wurden drei identische Funktionsmuster (FM) hergestellt. Dabei wurden an drei verschiedenen Tagen jeweils alle Antigene bzw. Antikörper des Testformates an die Mikrosphären gekoppelt und anschließend sowohl im Testmix bezüglich möglicher Fehler kontrolliert als auch als Beadmix mit dem humanen Prüfpanel und Anti-Human-IgG-R-Phycoerythrin getestet.

FM 1 und FM 2 dienten im Anschluss v.a. für Versuchstestungen und für den Nachweis der Reproduzierbarkeit auch mit porzinem Serum und FTS. FM 3 hingegen war das FM, auf welchem alle beprobten Tiere letztendlich getestet wurden. Dies

geschah, um auszuschließen, dass mögliche Unterschiede zwischen den FM die Aussagekraft beeinflussen.

5.3 EINSTELLUNG DER DETEKTORMOLEKÜLE

5.3.1 Schachbrettitration

Das als Fluoreszenzfarbstoff dienende R-Phycoerythrin lag im *recomBead* Yersinia human an Anti-IgG konjugiert vor, welches kommerziell erhältlich ist. Allerdings gab es keine kommerziell erhältlichen porcinen Anti-IgG Antikörper, die mit R-Phycoerythrin (PE) konjugiert waren zum Zeitpunkt des Versuchsstartes.

Um eine Bindung zwischen porcinen Antikörpern und R-Phycoerythrin zu ermöglichen, wurde deshalb ein Zwischenschritt benötigt. Im ersten Schritt wurde ein porciner Anti-IgG Antikörper, welcher an Biotin konjugiert war, im Folgenden oft nur „Biotin“ genannt, eingesetzt. Dieser band innerhalb von 60 min Inkubationszeit an die Serum-Antikörper. Im Anschluss an die Inkubationszeit wurden diese Antikörper über die Vakuumstation abgesaugt, die Wells wurden dreimal mit je 200 µl SVP gewaschen und die Platte wurde ausgeschlagen. In einem zweiten Schritt wurde Streptavidin (SA) eingesetzt, welches an Biotin band. SA wiederum war kommerziell erhältlich an PE konjugiert. In einer weiteren 30-minütigen Inkubationszeit band nun Streptavidin-PE an Biotin und ermöglichte so die Messung der Fluoreszenz.

Da für eine zweistufige Konjugation mit Biotin sowie Streptavidin-PE noch keine Daten vorlagen hinsichtlich einzusetzender Menge und Konzentration, wurde zunächst ein Titrationsversuch angesetzt. Die Ausgangssubstanzen hierfür waren:

- Anti-Schwein-IgG mit Biotin konjugiert in einer Konzentration von 1 mg/ml des Herstellers Dianova
- Streptavidin konjugiert mit PE in einer Konzentration von 1 mg/ml des Herstellers Invitrogen

Um aussagekräftige Werte zu erhalten, benötigte man zunächst Schweineseren, von denen eine starke Fluoreszenz erwartet werden konnte. In einem Vorversuch im *recomLine* Yersinia human wurden vordefinierte Schweineseren der Firma Mikrogen getestet. Enthaltene Parameter dabei waren YopM, VAG-A, PsaA, YopD, MyfA und

YopE. Es wurden vier Schweine ausgewählt, die im *recomLine* Yersinia human ein deutlich positives Signal, eine kräftige Bande, bei YopD zeigten.

Es erfolgte für jedes Serum eine Schachbretttitration mit acht Verdünnungsstufen des Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin (Dianova GmbH) sowie sechs Verdünnungsstufen von Streptavidin-PE (Invitrogen). Dabei wurde jede Konzentration des Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin mit jeder Konzentration von Streptavidin-PE kombiniert. Die Verdünnungsstufen für Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin betrugen 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500, 1:750 sowie 1:1000. Für Streptavidin-PE wurde mit den Verdünnungsstufen 1:100, 1:250, 1:500, 1:750, 1:1000 und 1:2000 gearbeitet. Die Verdünnung erfolgte für alle Detektormoleküle jeweils mit Stabilguard® (Immunoassay Stabilizer, SurModics Inc., Eden Prairie, Minnesota, USA).

Der Beadmix zur Austestung bestand in diesem Fall lediglich aus gekoppeltem YopD, um dessen Fluoreszenzstärke bestimmen zu können sowie aus der FK, um erkennen zu können, ob der Nachweis der Detektormolekülzugabe in ausreichendem Maße erfüllt wurde.

5.3.2 Einzelbestimmung der Fluoreszenzkontrolle

Aufgrund niedriger Signalstärken an MFI der FK erfolgte ein weiterer Ansatz. Um herauszufinden, ob möglicherweise das Schweineserum oder Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin eine Wechselwirkung auslösten, die die MFI-Werte erniedrigten, wurde eine Nachtestung durchgeführt, bei der der Beadmix nur aus der FK bestand und ausschließlich mit Streptavidin-PE in den gleichen Verdünnungsstufen inkubiert wurde.

5.3.3 Einsatz von Streptavidin-PE der Hersteller Prozyme und Moss

Um Reaktivitätsunterschiede zwischen den Chargen unterschiedlicher Hersteller auszuschließen, wurde die zuvor beschriebene Schachbretttitration mit Streptavidin-PE zweier anderer Hersteller (Prozyme, Hayward, Kalifornien, U.S.A.; Moss, Pasadena, Maryland, U.S.A.) wiederholt. Während Streptavidin-PE von Moss ebenfalls in einer Konzentration von 1 mg/ml vorlag, lag jenes von Prozyme in einer Konzentration von 2,2 mg/ml vor, was eine Vorverdünnung mit Stabilguard®

(Immunoassay Stabilizer, SurModics Inc.) auf 1 mg/ml nötig machte, um die gleiche Ausgangslage zu gewährleisten.

5.3.4 Streptavidin-PE von Prozyme und Moss im Test mit Serum

Um mögliche Reaktivitätsunterschiede genauer analysieren zu können, wurde eine weitere Titrationsreihe mit verschiedenen Streptavidin-PE Konzentrationen an verschiedenen Schweinen durchgeführt. Getestet wurde erneut mit dem Beadmix mit FK und YopD. Als Versuchsseren wurden ebenfalls wieder Schweineseren mit starkem Ausschlag von YopD auf dem *recomLine* Yersinia human ausgewählt (Nr. 14, Nr. 17, Nr. 38, Nr. 40). Als Negativkontrolle wurde ein spezifisches Negativserum eines gnotobiotischen Ferkels eingesetzt. Die Biotinkonzentration wurde mit 1 ng/µl konstant gehalten.

Die Austestung erfolgte jeweils für Streptavidin-PE des Herstellers Prozyme sowie für zusätzliches Streptavidin-PE des Herstellers Moss (Moss, Pasadena, Maryland, U.S.A.). Es lag in einer Ausgangskonzentration von 1 mg/ml vor. Die Verdünnungsstufen je Streptavidin-PE blieben die gleichen sechs der vorigen Versuche (siehe Nr. 5.3.1.).

5.3.5 Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin

Von der Firma Moss wurde ein Sekundärantikörper als Detektormolekül bezogen, bei welchem – wie im *recomBead* Yersinia human – R-Phycoerythrin direkt an Anti-Schwein-IgG konjugiert war und das speziell für diese Studie hergestellt wurde. Dessen Ausgangskonzentration betrug 1 mg/ml. Es erfolgte eine erneute Verdünnungsreihe im Test mit den fünf Seren des vorangegangenen Versuches (Nr. 14, Nr. 17, Nr. 38, Nr. 40 sowie das gnotobiotische Ferkel). Die Verdünnungsstufen orientierten sich dabei an den Konzentrationen der Anti-Human-IgG-Antikörper konjugiert mit R-Phycoerythrin im *recomBead* Yersinia human. Die eingesetzten Stufen der Verdünnung betrugen daher 1:250, 1:325, 1:650, 1:975 sowie 1:1950. Verdünnungsmittel war auch hierbei Stabilguard® (Immunoassay Stabilizer, SurModics Inc.).

5.3.6 Titration mit Vorinkubation von Biotin und Streptavidin-PE

Auch nach Vorliegen von Anti-Schwein-IgG konjugiert an R-Phycoerythrin sollte getestet werden, ob es möglich ist, Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin und

Streptavidin-PE im Vorfeld miteinander zu konjugieren. Ziel hierbei war die Einsparung des zusätzlichen Waschschrilles sowie der erneuten Inkubation, die bei Einsatz von Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin und Streptavidin-PE nacheinander notwendig sind. Zum Versuch wurde erneut eine Schachbrettitration durchgeföhrt. Dabei wurden Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin (Dianova GmbH) sowie Streptavidin-PE des Herstellers Moss gewöhlt. Beide hatten eine Ausgangskonzentration von 1 mg/ml und wurden in je vier Verdünnungsstufen mit Stabilguard® (Immunoassay Stabilizer, SurModics Inc.) eingesetzt. Für Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin wurden Verdünnungsstufen von 1:100, 1:200, 1:500 und 1:1000 gewöhlt. Bei Streptavidin-PE wurden Verdünnungen von 1:50, 1:100, 1:250 sowie 1:500. Getestet wurde eine Vorinkubation von 60 min bei 37 °C im Vergleich zu 30 min bei 37 °C mit den gleichen Seren wie im Versuch mit Anti-Schwein-IgG konjugiert an R-Phycoerythrin.

5.4 EINSTELLUNG DER INKUBATIONSKONTROLLE

Die Inkubationskontrolle (IK) diene dem Nachweis der Zugabe von Serum zu jedem Well. Zu diesem Zweck wurden an die Mikrosphären speziesspezifische Anti-Immunglobulin-Antikörper gekoppelt, die dann mit beliebigen Antikörpern der gleichen Immunglobulin-Klasse banden und so nach Inkubation mit dem Detektormolekül messbare Fluoreszenz aufwiesen.

Für den Test mit porzinem Serum und FTS konnte die IK aus dem *recomBead Yersinia human* nicht übernommen werden, da diese speziesspezifisch ist. Zur Einstellung der IK wurden nun Ziege-Anti-Schwein-IgG-Antikörper (Dianova GmbH) in verschiedenen Beschichtungsstärken an die Beads gekoppelt. Ziel war das Erreichen der Sättigung der Beschichtungsstärke, messbar an der Signalstärke (in MFI).

Die Kopplung erfolgte nach dem regulären oben beschriebenen Kopplungsvorgang für die Inkubationskontrolle mit den Beschichtungskonzentrationen von 25, 50, 100 und 200 ng/µl. Um alle vier Kopplungen in einem Beadmix mit Serum zu testen, mussten diese auf vier verschiedene Beadregionen beschichtet werden. Erst nach Bestimmung der optimalen Beschichtungsstärke wurde die Kopplung auf der endgültigen Region wiederholt. Der zunächst hergestellte Beadmix der vier Kopplungen wurde nun mit Serum der vier Schweine (Nr. 14, Nr. 17, Nr. 38, Nr. 40) sowie des Ferkels im Vergleich zum Ansatz mit reinem Serumverdünnungspuffer (Pufferwert) angesetzt und mit Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin in einer Konzentration von 3 ng/µl inkubiert.

5.5 EINSTELLUNG DER BESCHICHTUNGSKONZENTRATIONEN FÜR YOPH UND YOPN

Analog zur Einstellung der Inkubationskontrolle wurde nun für die Antigene YopH und YopN vorgegangen. Aufgrund des bekannt hohen Aggregationsverhaltens von YopH und YopN, das sich innerhalb von Testreihen der Firma Mikrogen gezeigt hatte, wurden niedrige Beschichtungskonzentrationen von 10 und 30 ng/µl gewählt.

5.6 ANWENDUNG DES HERGESTELLTEN BEADASSAYS MIT SERUM

Nach Zusammenstellung des endgültigen Beadmixes erfolgte die Abarbeitung der Austestung analog dem *recomBead Yersinia human*. Dazu wurde die Mikrofilterplatte

zunächst mit 50 µl SVP pro Well befeuchtet. Dieser wurde anschließend durch Absaugen über der Vakuumstation entfernt. Nun wurde je Well 50 µl der durchmischten Beadmixlösung sowie 50 µl der jeweiligen Probe zugegeben. Die Platte wurde dann, nach kurzem Mischen auf dem Schüttler, 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach dem Absaugen der Kavitäten folgte ein dreifacher Waschschrift mit je 200 µl SVP. Auch dieser wurde zuletzt wieder über die Vakuumstation entfernt. Danach wurde in jede Kavität 50 µl Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin zugegeben. Dies lag in einer Konzentration von 3 ng/µl vor. Es folgte eine erneute Inkubation, nach kurzem Mischen auf dem Schüttler, für 30 min bei 37 °C. Abschließend wurden alle Wells über die Vakuumstation abgesaugt, mit jeweils 100 µl Mantelflüssigkeit (LiquiChip) aufgefüllt und nach kurzem Mischen auf dem Schüttler im Analysesystem gemessen. Getestet wurden alle vorhandenen 551 Seren.

5.7 MESSUNG DES TESTES

Die Messung der Wells erfolgte im Analysesystem der Firma Luminex. Dazu wurde die Filterplatte auf die sogenannte XY-Plattform gegeben und die Messung anschließend via Luminex100™ Software vom Computer aus gestartet. Die einzelnen Proben je Well wurden nun vollautomatisch über eine Kolbenpumpe aus der Mikrofilterplatte entnommen und zur Messküvette geleitet. Während dieses Vorganges wird der Probenstrahl von LiquiChip umspült, um eine wirbelfreie Strömung zu erzeugen. Ziel war dabei eine Vereinzelung der Beads mittels jener hydrodynamischen Fokussierung, um sie nun mittels des Lasers detektieren zu können. Die gezählten Beads pro Region sowie die Fluoreszenzstärke wurden parallel zur laufenden Messung in der Software angezeigt. Auch die Laufzeiten je Well waren unmittelbar ersichtlich. Nach Abschluss der Messung konnten sämtliche Daten als .csv-Datei in eine Excel Tabelle übernommen werden.

5.8 AUSWERTUNG DES ASSAYS

Die Rohdaten der Austestung wurden in Form einer .csv-Datei aufgerufen und in eine Excel Tabelle konvertiert. Ersichtlich waren für jedes Serum die gemessenen MFI-Werte je Region, sprich pro Antigen bzw. Antikörper, sowie die gemessenen Counts. Eine Auswertung des Testes kann nur vorgenommen werden, wenn

Inkubationskontrolle und Konjugatkontrolle deutlich positiv sind und pro Region über 50 Beads gemessen werden.

Die weitere Auswertung der Antigene beruhte auf ihren Cut-Off-Indizes. Sie wurden anhand der Auswertungssoftware *recomQuant* der Firma Mikrogen berechnet. Lag der Cut-Off-Index (COI) unter 0,67, so galt dies als negatives Ergebnis. Größer gleich 0,67 und kleiner 1 galt als fraglich und größer gleich 1 als positiv. Das Ergebnis wurde für jedes Antigen einzeln bestimmt. Berechnet wurde der COI anhand eines Quotienten, in welchem MFI Wert des jeweiligen Antigens, MFI Wert der IK, Cut-Off-Wert sowie eine Konstante enthalten waren. Die Berechnung erfolgte mit einer Auswertungssoftware der Firma Mikrogen.

Der Cut-Off (CO) wurde in der Regel anhand eines Serenpanels, das definiert positive und definiert negative Seren enthielt, eingestellt. Die Einstellung erfolgte durch den Testentwickler und musste zwei Zielvorgaben erfüllen. Zum einen sollte eine Wiederfindungsrate von über 95 % erreicht werden, zum anderen sollten die COI-Werte der jeweiligen Antigene möglichst identisch sein.

Im Falle des *recomBead* Yersinia pig war die Einstellung des CO nach zuvor erläuteter Methode nicht möglich, da kein definiertes Serenpanel zur Verfügung stand. Daher erfolgte dies statistisch mittels ROC Analyse (NIELSEN et al., 2004). Grundvoraussetzung hierfür war eine genügend große Menge an Seren und Fleischtropfsaftproben. Ausgehend von einem Konfidenzlevel von 95 % und einem Konfidenzintervall von 5 % wurde die entsprechende Mindeststichprobengröße von über 384 mit den vorhandenen 551 bzw. 368 Proben erreicht. Es handelt sich also um eine Stichprobe, bei der zu 95 % sichergestellt ist (Konfidenzlevel), dass die Eigenschaften jeder theoretisch möglichen Stichprobenkombination maximal 5 % nach oben oder unten (Konfidenzintervall) von den Eigenschaften der Probe abweichen (BLEYMÜLLER, 2012).

Ziel war es, die Streuung so gering wie möglich zu halten, also CO-Werte zu finden, bei denen sich eine größtmögliche Unterscheidung in positive und negative Proben mit einer möglichst geringen Anzahl an fraglichen Ergebnissen ergab. Im zweiten Schritt wurden die Ergebnisse mit denen des ELISA verglichen und damit die Einstellung des CO kontrolliert. Dabei wurde der CO anfangs als Konstante von 10 gewählt. Danach erfolgte eine anfängliche Beurteilung der Antigene nach der Regel,

dass jeder COI unter 0,67 als negativ galt, jeder größer gleich 0,67 und kleiner 1 als fraglich sowie größer als 1 als positiv. Diese initiale Beurteilung ist nicht als wahr anzusehen, sie diente lediglich als Zwischenschritt. Innerhalb der programmierten Excel Tabelle konnten dabei die Summe der negativen, fraglichen und positiven Ergebnisse für jedes Antigen pro Serum und auch für jedes Serum insgesamt abgelesen werden. Anhand des CO konnten nun für jedes Antigen die Grenzen zu negativ, fraglich und positiv verschoben werden. Ziel dieser statistischen Einstellung waren möglichst wenig fragliche Seren pro Antigen. Das heißt im Umkehrschluss, dass eine Unterscheidung in negativ und positiv so deutlich wie möglich getroffen werden kann.

Nach der Einstellung des CO erfolgte die Einteilung in insgesamt positive, fragliche und negative Proben. Dabei wurden alle positiven Antigene bis auf YopD einfach gezählt. YopD hingegen wurde aufgrund seiner Eigenschaft als Markerantigen dreifach gezählt. Dies erfolgte nach einem bei der Firma Mikrogen eingeführten Auswertungsregime, nachdem bei firmeninternen Testreihen festgestellt wurde, dass bei positiven Seren stets eine Serokonversion bei YopD zu finden war. Fragliche Antigene erhielten keine Punktzahl.

Ein Serum wurde als *Yersinia*-positiv bewertet, wenn die Punktzahl größer als 2 war. Bei 2 Punkten handelte es sich um ein fragliches Serum. Werte darunter galten als negativ (Tab. 10).

Tabelle 10: Klassifizierung der Seren in *Yersinia*-positiv, fraglich und negativ

Erhaltene Punktzahl	Klassifizierung der Seren
>2	Positiv
2	Fraglich
0-1	negativ

Die Speziesdifferenzierung folgte analog den im *recomBead Yersinia human* geltenden Richtlinien: War das Testergebnis positiv, PsaA reagierte größer oder gleich CO und MyfA reagierte kleiner gleich CO, so wurde von einer Infektion mit *Y. pseudotuberculosis* ausgegangen. Verhielt es sich exakt umgekehrt und PsaA reagierte bei einem positiven Testergebnis kleiner gleich CO während MyfA größer gleich CO war, so sprach dies für eine *Y. enterocolitica* Infektion. Waren bei einem

positiven Testergebnis weder die einen noch die anderen Kriterien erfüllt, so konnte keine Speziesdifferenzierung vorgenommen werden (Tab. 11).

Tabelle 11: Kriterien zur Speziesdifferenzierung

Kriterien	Speziesdifferenzierung
Punktzahl >2 und $Psa \geq CO^1$ und $MyfA \leq CO^1$	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Punktzahl >2 und $MyfA \geq CO^1$ und $Psa \leq CO^1$	<i>Y. enterocolitica</i>
Punktzahl >2 und sowohl Psa als auch $MyfA \geq CO^1$ <u>oder</u> Punktzahl >2 und sowohl Psa als auch $MyfA \leq CO^1$	Keine Speziesdifferenzierung möglich

¹CO = CutOff

5.9 REPRODUZIERBARKEIT MIT PORZINEM SERUM

Um die Reproduzierbarkeit auch für porcine Seren darzulegen, wurde ein Prüfpanel an Schweineseren zusammengestellt. Dies enthielt sowohl Seren mit hohen Signalstärken (20 Seren) als auch Seren mit Signalstärken, die annähernd denen der Negativkontrolle (16 Seren) entsprachen. Insgesamt wurde ein Panel von 36 Seren auf allen drei FM getestet.

5.10 FLEISCHTROPFSAFTVERDÜNNUNG

Bislang standen keine Daten zum Einsatz von FTS in Bead-Assays zur Verfügung. Aus diesem Grund ließ sich hier im Vornhinein keine Aussage zur möglichen Verdünnung treffen. Es wurde daher eine Verdünnungsreihe, mit SVP als Verdünnungsmittel, getestet. Zum Einsatz kam eine zufällig gewählte Stichprobe von

vier Fleischtropfsaftproben. Initial wurde der FTS sowohl pur als auch in den Verdünnungsstufen 5:1, 2,5:1, 1:1, 1:2,5, 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 eingesetzt.

Desweiteren wurde nach Möglichkeiten gesucht, die eine höhere Verdünnung ermöglichen und weniger Gefahr bargen, das Messsystem mechanisch zu verstopfen. Dazu wurden eine Zentrifugation des FTS (10 min) mit einer Filtration verglichen:

- FTS 10 min bei maximaler Umdrehung zentrifugiert und anschließend Verdünnung des Überstandes 1:20, 1:40, 1:80, 1:160
- Filtration des FTS mittels Filteraufsätzen mit einer Porengröße von 0,22 µm und anschließend Verdünnung des Filtrates 1:20, 1:40, 1:80, 1:160
- Zentrifugation für 10 min bei maximaler Umdrehung sowie Filtration des Überstandes mittels Filteraufsätzen mit einer Porengröße von 0,22 µm und anschließend Verdünnung des Filtrates 1:20, 1:40, 1:80, 1:160

5.11 ANWENDUNG DES HERGESTELLTEN ASSAYS MIT FTS

Die Testabarbeitung mit FTS erfolgte in der Vorgehensweise analog dem Serum in einer Verdünnung von 1:100. Als Konjugat diente auch hier Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin in einer Konzentration von 3 ng/µl. Getestet wurden alle vorhandenen 368 Fleischtropfsaftproben. Auch sie wurden analog dem Serum im Analysesystem gemessen.

5.12 REPRODUZIERBARKEIT MIT FTS

Die Reproduzierbarkeit sollte auch an Fleischtropfsaftproben dargelegt werden. Dazu wurde auch hier ein Prüfpanel an Fleischtropfsaftproben zusammengestellt. Es handelte sich dabei um acht Proben mit sehr geringer Fluoreszenzstärke sowie um 16 Proben mit äußerst hohen MFI-Werten. Das Panel wurde ebenso wie das des Serums auf allen drei FM getestet.

5.13 REFERENZMETHODE

Als Referenzsystem wurde der für Schweineseren und FTS validierte und vom FLI zugelassene PIGTYPE® YOPSCREEN ELISA der Firma QIAGEN Leipzig GmbH

herangezogen. Er diente zum Nachweis von IgG-Antikörpern gegen enteropathogene *Yersinia*-Stämme. Der PIGTYPE® YOPSCREEN folgte dem Prinzip des zuvor beschriebenen indirekten ELISA. Dabei wurde eine Mikrofilterplatte mit einem bzw. mehreren Antigenen beschichtet. In diesem Fall handelte es sich dabei um die rekombinant hergestellten *Yersinia*-Antigene YopD, YopE, YopH und YadA. Anschließend erfolgte die Probeninkubation mit Serum- bzw. Fleischtropfsaftproben, bei der Yersinien-spezifische Antikörper an die immobilisierten Antigene banden. Nichtgebundenes Probenmaterial wurde durch Waschen entfernt. Durch einen Peroxidase-konjugierten Anti-Schwein-IgG-Antikörper wurden die gebundenen Antikörper detektiert. Auch hier wurde nicht gebundenes Material anschließend durch Waschen entfernt. Die Farbreaktion wurde dann durch Zugabe des Substrates (TMB) gestartet und nach Inkubation durch Schwefelsäure abgestoppt. Die optische Dichte wurde nun umgehend im Photometer bei 450 und 620 nm gemessen. Durch einen internen Standard wurde daraus die Konzentration der Anti-*Yersinia*-Antikörper ermittelt und ermöglichte damit eine Quantifizierung der Antikörpermenge in der jeweiligen Probe. Die Durchführung des Testes erfolgte laut Gebrauchsinformation des Testkits, wobei das Serum 1:100 zu verdünnen war. Die Abarbeitung mit FTS erfolgte analog zu der mit Serum, mit dem Unterschied, dass der FTS nur 1:10 zu verdünnen war. Stets mitgeführt wurden Positiv- und Negativkontrollen in Doppelbestimmung.

Die Auswertung von Serum und FTS erfolgte nach Herstellerangaben (QIAGEN Leipzig GmbH). Es wurde dabei jedoch ausschließlich in positive und negative Proben unterschieden. Einen fraglichen Bereich gab der Hersteller nicht an.

5.14 SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Zur Einschätzung der Leistungsfähigkeit des Testsystems wurden abschließend Sensitivität und Spezifität anhand der Referenzmethode getrennt für Serum und FTS berechnet. Die Sensitivität gibt den Anteil an richtig positiven Ergebnissen an der Gesamtheit der positiven Ergebnisse wieder. Rein rechnerisch setzt man dabei die Anzahl an positiv getesteten Proben in ein Verhältnis zu den positiven plus den falsch negativen Proben (NIELSEN et al., 2004).

$$\text{Sensitivität} = \frac{\text{Anzahl richtig positiver}}{(\text{Anzahl richtig positiver} + \text{Anzahl falsch negativer})}$$

Im Fall des entwickelten Testsystems entsprach dies damit den im Beadassay positiven Proben im Verhältnis zu den im ELISA positiven Proben.

Dementsprechend gibt die Spezifität den Anteil der korrekt negativen Ergebnisse an der Gesamtzahl der negativen Proben wieder. Die Berechnung erfolgt anhand der negativen Proben im Verhältnis zu den negativen plus den falsch positiven Proben (NIELSEN et al., 2004).

$$\text{Spezifität} = \frac{\text{Anzahl richtig negativer}}{(\text{Anzahl richtig negativer} + \text{Anzahl falsch positiver})}$$

Analog zur Sensitivität wurden also die im Beadassay negativen Proben in ein Verhältnis zu den im ELISA negativen Proben gesetzt.

IV ERGEBNISSE

6 RECOMBEAD YERSINIA PIG

6.1 ABSCHLIESSENDE ÜBERPRÜFUNG DER BESCHICHTETEN BEADPOPULATIONEN

Während der Kopplung von allen drei Funktionsmustern kam es bei einzelnen Kopplungschargen sowohl zu Agglutinationen als auch zu verminderten Beadkonzentrationen. Um dies zu überprüfen, erfolgte nach der Kopplung stets die Analyse des Testmixes. Eine fehlerhafte Kopplungscharge resultierte in weniger als 50 gemessenen Beads innerhalb der erlaubten Zeitspanne von 100 s im Testmix. War dies der Fall, wurde die jeweilige Kopplungscharge verworfen, die Kopplung wurde wiederholt. Insgesamt kam es im Laufe der Entwicklung des Testsystems bei 1/6 der gekoppelten Beadregionen zu Problemen, die eine Wiederholung der Kopplung notwendig machten. Dabei waren die Regionen YopD, YopH und YopN doppelt so häufig betroffen wie die anderen Regionen.

Allerdings ließen sich Unterschiede der Kopplungschargen im Hinblick auf die Beadkonzentration nicht immer ganz ausschließen. Um trotzdem einen homogenen Beadmix herzustellen, wurden diese durch ein größeres Volumen der einzusetzenden Menge der entsprechenden Region ausgeglichen. Die Berechnung der einzelnen erforderlichen Volumina erfolgte anhand eines firmeninternen Berechnungsprotokolls. Berücksichtigte Faktoren hierbei waren Laufzeit des Testmixes, gefundene Beads pro Region, erwünschtes Gesamtvolumen des herzustellenden Beadmixes sowie die angestrebte Laufzeit pro Well während der Analyse mit Probenmaterial.

Die Beadmixe wurden entsprechend dem firmeninternen Formblatt der Beadmixberechnung hergestellt und im Kühlschrank bei 7 °C bis zum Gebrauch aufbewahrt.

6.2 ÜBERPRÜFUNG DER GEKOPPELTEN ANTIGENE AUF IHRE REAKTIVITÄT

Alle drei Funktionsmuster reagierten im Test mit den 32 definierten Seren des Prüfpanels des *recomBead Yersinia human* gemäß den Sollwerten und waren damit hinsichtlich ihrer Reaktivität als einwandfrei zu beurteilen. Bei den Sollwerten handelt

es um insgesamt 192 einzelne Werte, die die COI je Serum vorgeben, die für ein jeweiliges Antigen erreicht werden sollen. Diese lagen für die jeweiligen 6 Antigene des *recomBead Yersinia human* bereits pro Serum vor und konnten so übernommen werden. Für die beiden Antigene YopH und YopN existierten allerdings keine definierten Sollwerte, da sie im humanen Test keine Verwendung fanden. Da für sie noch kein CO eingestellt war, konnte eine Analyse bzgl. der COI nicht vorgenommen werden.

Die Inkubationskontrolle musste gesondert getestet werden. Da es sich bei dieser für den *recomBead Yersinia pig* um einen porcinen Antikörper handelte, ließ sich nach einer Austestung mit Anti-Human-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin des *recomBead Yersinia human* lediglich eine geringere Kreuzreaktivität feststellen. Aufgrund dessen wurde dieser Parameter gesondert mit beliebigem Schweineserum und entsprechendem Sekundärantikörper getestet. Die geforderte Signalstärke von über 6.000 MFI konnte für alle Kopplungen der Funktionsmuster nachgewiesen werden. Zusammenfassend ließ sich damit sagen, dass insgesamt drei erfolgreiche Funktionsmuster zur Verfügung standen.

6.3 EINSTELLUNG DER DETEKTORMOLEKÜLE

6.3.1 Schachbretttitration

Bei der Auswertung der Ergebnisse der Schachbretttitration wurden die beiden variablen Parameter Anti-Schwein-IgG konjugiert an Biotin und Streptavidin-PE getrennt voneinander betrachtet. So ging man zunächst auf die Veränderung der MFI-Werte in Abhängigkeit der Biotin Konzentration (Dianova) bei konstanter Streptavidin-PE Konzentration (Invitrogen) ein. Anhand des Messparameters YopD ließ sich so erkennen, dass eine Steigerung der Biotinkonzentration keine relevanten Veränderungen der MFI bewirken konnte. Obwohl die gemessenen Werte teilweise oberhalb der Messgrenze von 20.000 MFI lagen, waren die je nach Streptavidin-PE Konzentration liegenden Graphen weitestgehend einheitlich. So konnte folgernd aus den Ergebnissen geschlossen werden, dass die Sättigungsgrenze für Biotin bereits bei einer Konzentration von 1 ng/μl erreicht wurde. Dies wird beispielhaft an einem Serum des gleichen Schweins in Abbildung 9 dargestellt (Abb. 9). Anhand dieses Versuches wurde für alle weiteren Tests eine Biotinkonzentration von 1 ng/μl festgelegt.

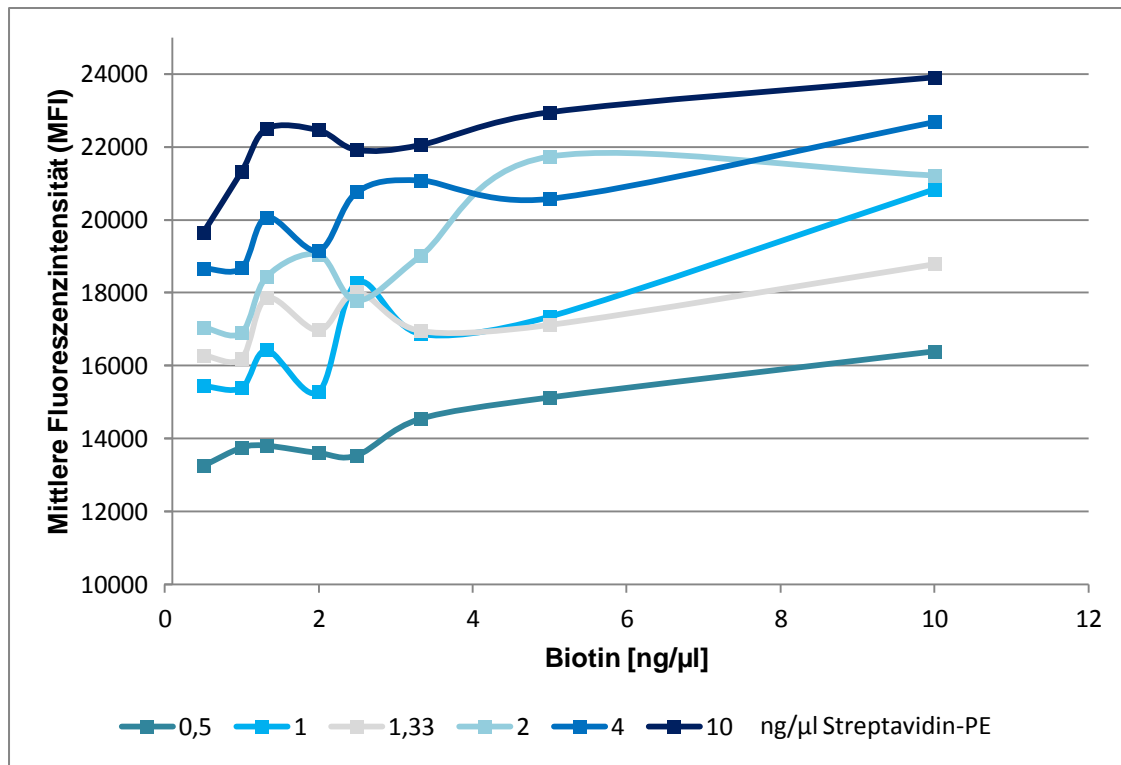


Abbildung 9: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von YopD in Abhängigkeit von eingesetztem Biotin (Dianova) bei konstanter Konzentration an Streptavidin-PE (Invitrogen)

Im zweiten Schritt galt es, die Abhängigkeit der MFI-Werte des YopD von verschiedenen Konzentrationen von Streptavidin-PE (Invitrogen) bei konstanten Konzentrationen von Anti-Schwein-IgG konjugiert an Biotin (Dianova) zu ermitteln. In diesem Fall zeigten sich ebenfalls deutliche Sättigungskurven, für die ab einer Konzentration von 4 ng/μl Streptavidin-PE keine deutlich höheren Werte zu erreichen waren. Erneut werden die Graphen des Serums des zuvor beschriebenen Schweines graphisch in Abbildung 10 dargestellt (Abb. 10).

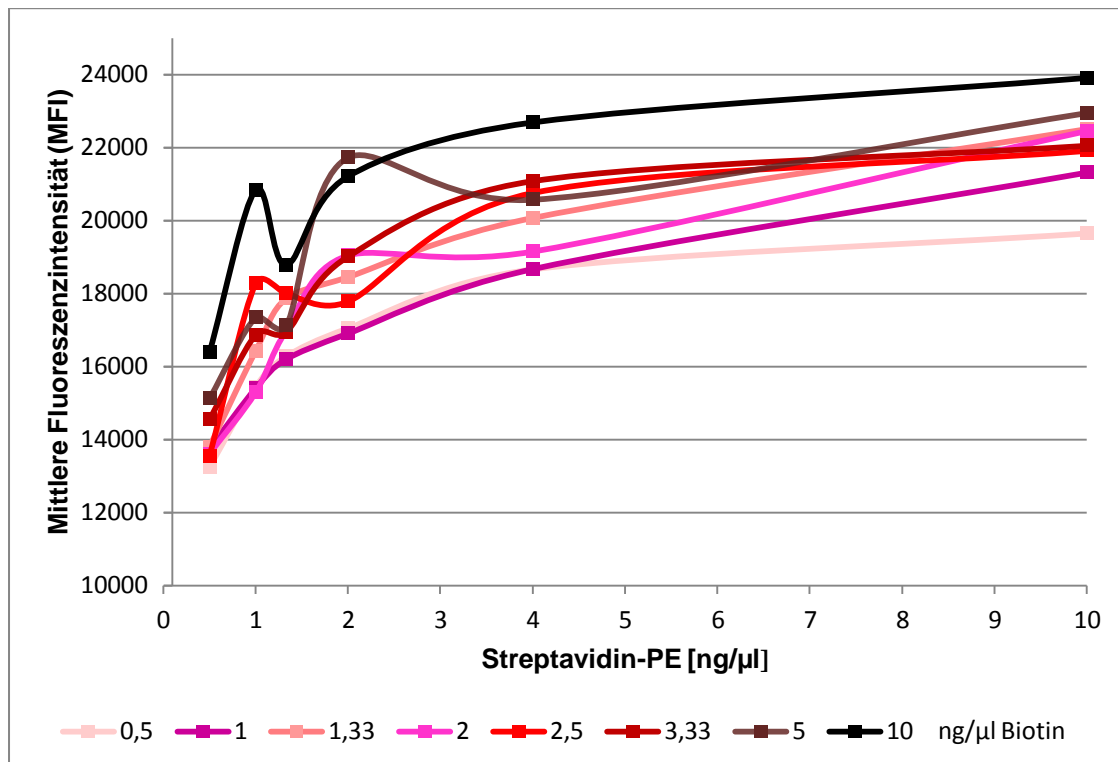


Abbildung 10: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von YopD in Abhängigkeit von eingesetztem Streptavidin-PE (Invitrogen) bei konstanter Konzentration an Biotin (Dianova)

Um die Reaktivität von Streptavidin-PE zu beurteilen, wurden zusätzlich die MFI-Werte der FK beurteilt. Da am Antikörper der FK lediglich Streptavidin-PE band, spielte die Biotin Konzentration in diesem Zusammenhang keine Rolle. Während man bei YopD bei hohen Konzentrationen bereits oberhalb der Messgrenze lag, konnte man bei der FK erkennen, dass sich nur Werte von maximal 6.400 MFI erzielen ließen (Abb. 11). Damit wurden die mindestens geforderten MFI von 4.000 zwar eingehalten, allerdings war von in Vergangenheit entwickelten Beadtests bekannt, dass die Signalstärke während der Lagerungszeit in der Regel um 1.000 bis 2.000 Beads sinken konnte (Firma Mikrogen, 2012, mündliche Information). Aufgrund

dessen lagen die erwünschten Werte der FK im Bereich von 6.000 bis 10.000 MFI. Streptavidin-PE von Invitrogen lag demnach knapp oberhalb der Mindestanforderungen.

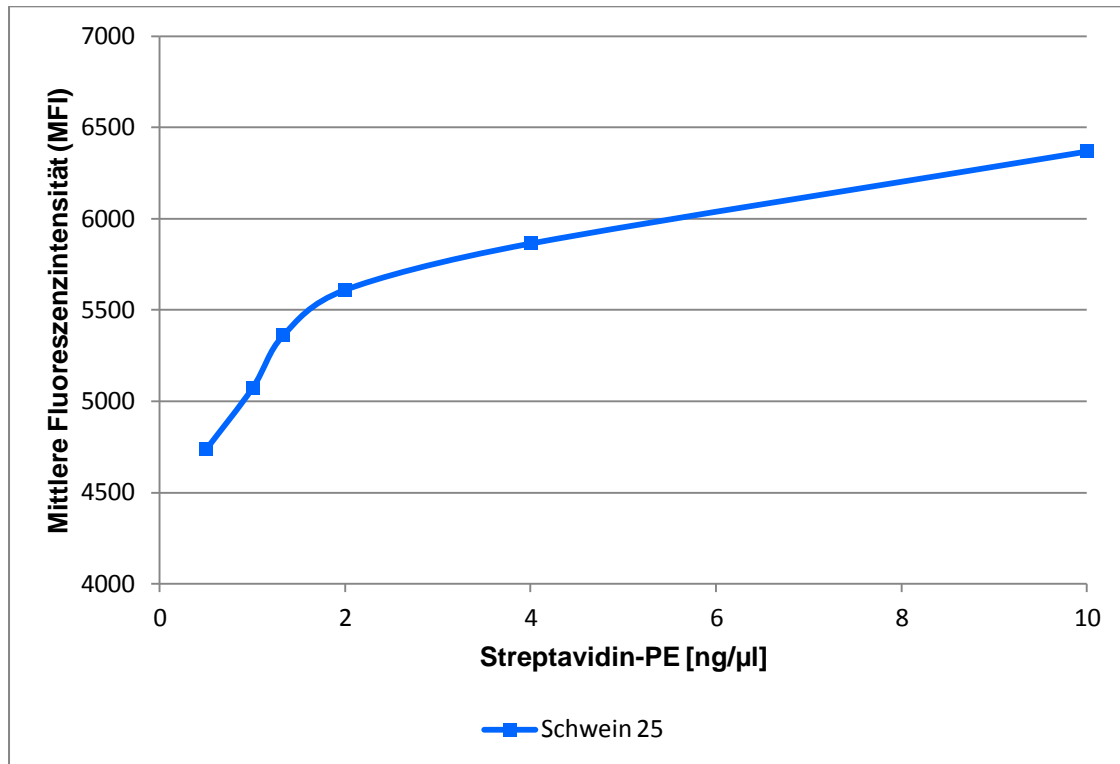


Abbildung 11: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der FK in Abhängigkeit der Streptavidin-PE-Konzentration (Invitrogen)

6.3.2 Nachtestung der FK zur Fehlerquellenaufspürung

Da die FK bereits mit Anti-Human-IgG konjugiert an R-Phycoerythrin des *recomBead* Yersinia human getestet wurde und sich dabei wesentlich höhere Werte erzielen ließen, konnte ein Fehler in der Kopplung ausgeschlossen werden. Deshalb wurde nach anderen Ursachen für die niedrigen MFI-Werte der FK mit Streptavidin-PE (Invitrogen) gesucht. Um herauszufinden, ob das porcine Serum oder der Anti-Schwein-IgG Antikörper konjugiert an Biotin eine Wechselwirkung auf die FK ausüben konnten, wurde eine Nachtestung durchgeführt, bei der der Beadmix nur aus der FK bestand und ausschließlich mit Streptavidin-PE in den gleichen Verdünnungsstufen inkubiert wurde. Es zeigte sich allerdings keine Veränderung der MFI-Werte. Die MFI-Werte dieses Versuchs sind in Abbildung 12 dargestellt (Abb. 12).

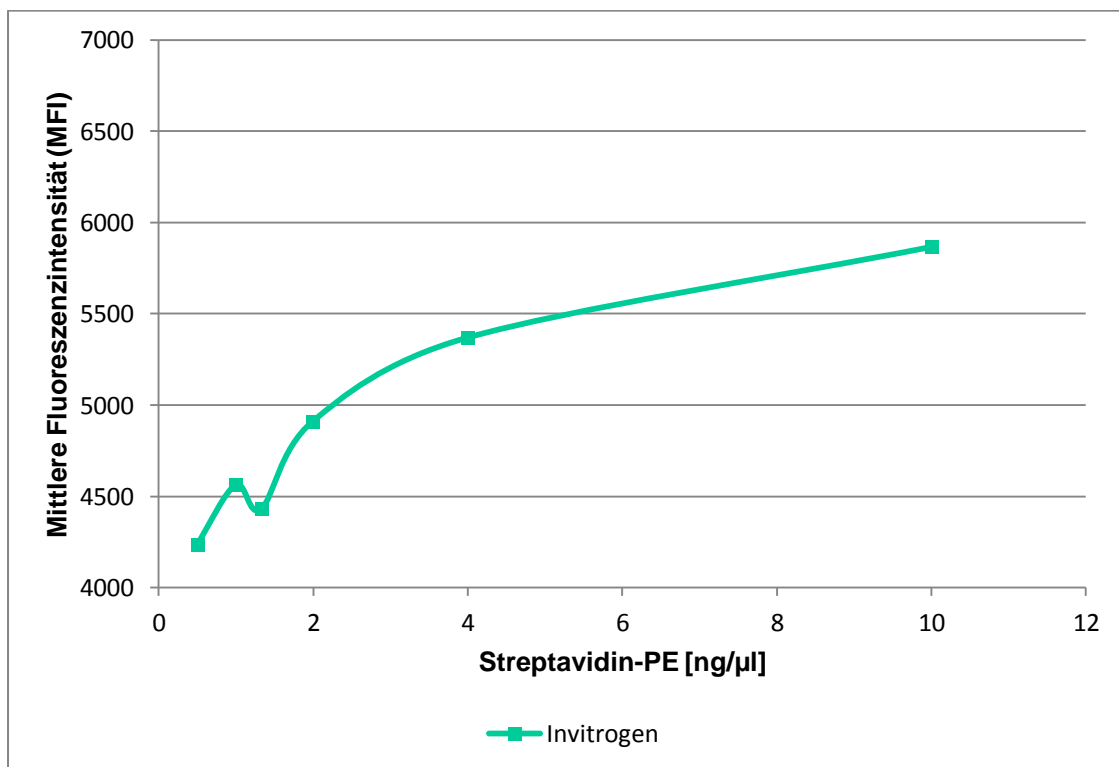


Abbildung 12: Abhängigkeit der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der FK von der Streptavidin-PE-Konzentration (Invitrogen) ohne Zugabe von Serum oder Biotin

6.3.3 Einsatz von Streptavidin-PE der Hersteller Prozyme und Moss

Eine weitere Ursache für die niedrigen MFI-Werte der FK konnten Reaktivitätsunterschiede zwischen den Chargen unterschiedlicher Hersteller sein.

Um dies auszuschließen, wurde der vorhergehende Versuch ohne Serum oder Biotin mit Streptavidin-PE der Hersteller Prozyme und Moss wiederholt. Während Streptavidin-PE des Herstellers Moss in der gleichen Konzentration wie das von Invitrogen vorlag, lag das des Herstellers Prozyme in einer Konzentration von 2,2 mg/ml vor, was eine Vorverdünnung auf 1 mg/ml nötig machte, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Klar zu erkennen war, dass mit beiden Streptavidin-PE deutlich höhere MFI-Werte zu erzielen waren. Dabei übertraf jenes Streptavidin-PE von Moss mit 6.500 bis knapp über 14.000 MFI den Hersteller Prozyme mit 2.000 bis 12.000 MFI sogar noch. Dies wird in Abbildung 13 graphisch dargestellt (Abb. 13).

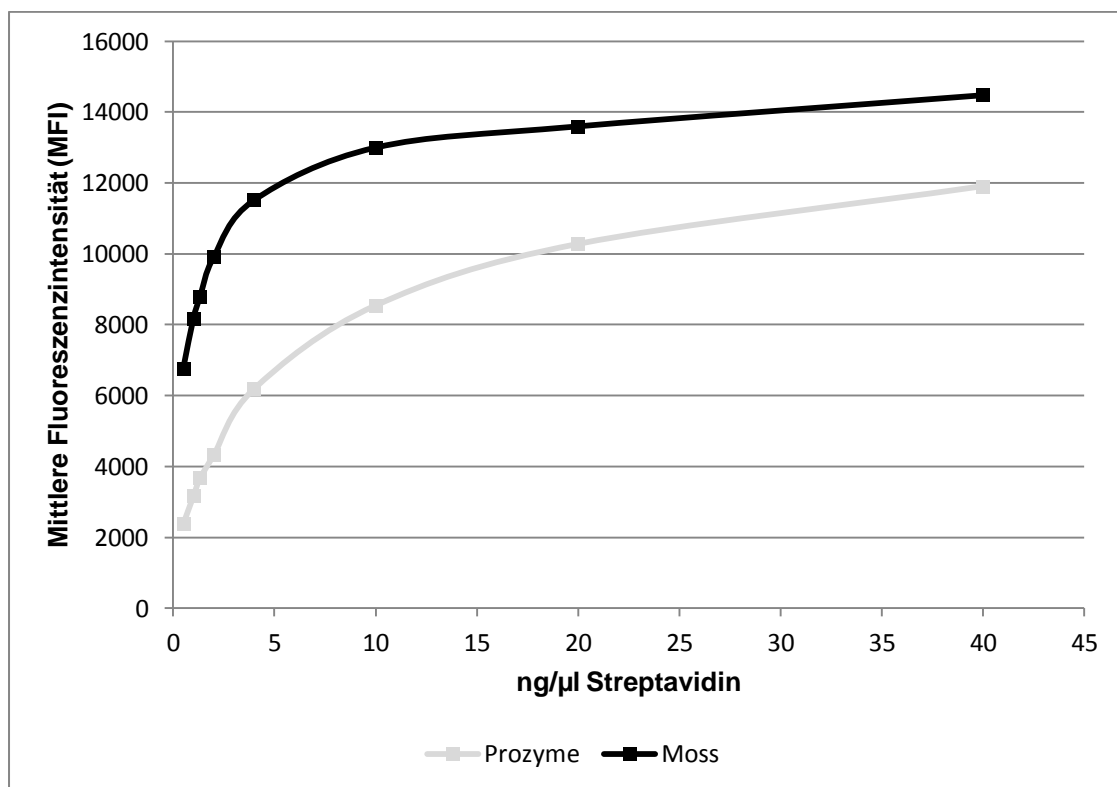


Abbildung 13: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der FK in Abhängigkeit der Streptavidin-PE-Konzentration zweier unterschiedlicher Hersteller (Prozyme und Moss)

6.3.4 Streptavidin-PE von Prozyme und Moss im Test mit Serum

Nachdem sich für die FK im Test mit Streptavidin-PE verschiedener Hersteller deutliche Abweichungen in der Höhe des Fluoreszenzsignals ergeben hatten, galten Unterschiede in deren Reaktivität damit als bewiesen. Um weiterführende Aussagen bezüglich ihres Verhaltens im Test mit Serum treffen zu können, wurden

Streptavidin-PE von Prozyme und Moss anschließend mit den Komponenten YopD und FK und der Zugabe von porzinen Seren getestet. Da nun wieder Seren zugefügt wurden, war auch die Zugabe von Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin zwingend notwendig. Es handelte sich dabei, wie bereits beschrieben, um Biotin (Dianova) in der festgelegten Konzentration von 1 ng/µl.

Getestet wurden die zuvor ausgewählten fünf Seren (Nr. 14, Nr. 17, Nr. 38, Nr. 40), unter ihnen das gnotobiotische Ferkel (F). Für YopD ließ sich im Falle von Streptavidin-PE von Prozyme ein Sättigungsbereich ab einer Konzentration von 10 ng/µl erkennen. Allerdings waren die MFI-Werte dabei für Seren mit hohen Signalstärken bereits im nicht mehr spezifisch aussagekräftigen Messbereich über 20.000 MFI. Die niedrigen Signalstärken konnten jedoch gut von den hohen Signalstärken unterschieden werden. Außerdem beachtenswert ist, dass negative Signale auch bei höherer Konzentration an Streptavidin-PE klar negativ blieben. So konnten im Falle des gnotobiotischen Ferkels in allen Konzentrationsstufen nur maximale MFI-Werte von ca. 200 MFI gemessen werden. Die Sättigungsbereiche der verschiedenen Seren je nach eingesetzter Streptavidin-PE Konzentration werden in Abbildung 14 deutlich (Abb. 14).

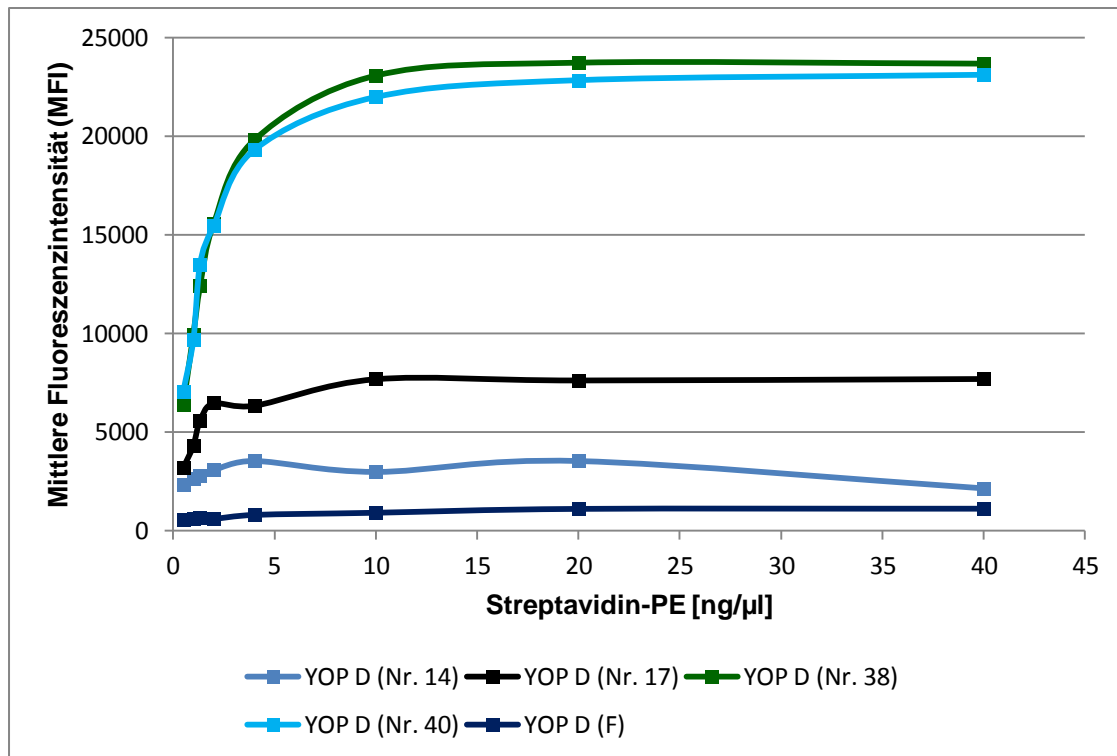


Abbildung 14: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von YopD in Abhängigkeit der Streptavidin-PE-Konzentration (Hersteller Prozyme) bei konstanter Biotin-Konzentration im Test mit vier unterschiedlichen porcinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)

Für die FK zeigte sich im Einsatz mit Serum und Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin das gleiche Bild wie ohne deren Zusatz. In Abbildung 15 sind die MFI-Werte zwischen 2.000 und 12.000 bei allen fünf Seren graphisch dargestellt (Abb. 15). Die Sättigungskonzentration verhielt sich dabei analog zu der von YopD bei 10 ng/µl.

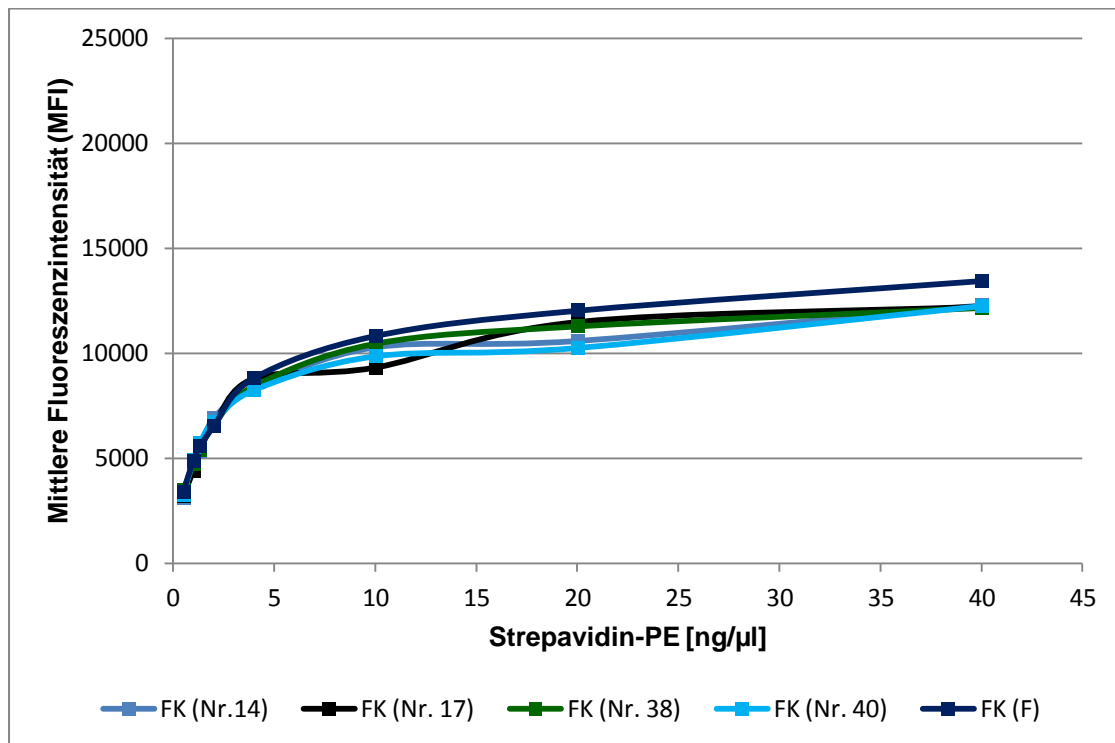


Abbildung 15: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der FK in Abhängigkeit der Streptavidin-PE-Konzentration (Hersteller Prozyme) im Test mit vier unterschiedlichen porzinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)

Vergleichend wurde nun der gleiche Versuchsablauf mit Streptavidin-PE des Herstellers Moss durchgeführt. Die Reaktivität von Moss übertraf die des von der Firma Prozyme hergestellten Streptavidin-PE sowohl bzgl. YopD als auch der FK deutlich. Bei beiden befand man sich hier bereits bei 4 ng/µl im Sättigungsbereich. Zudem war zu erkennen, dass auch die absoluten MFI-Werte der FK nochmals höher lagen als beim Hersteller Prozyme, das gnotobiotische Ferkelserum aber weiterhin mit unter 200 MFI als sicher negativ abzugrenzen war. Die Graphen der Seren für YopD und die FK sind in Abbildung 16 und 17 dargestellt (Abb. 16 und 17). Im Vergleich beider Hersteller miteinander fiel allerdings nicht nur auf, dass man bei Streptavidin-PE von Moss höhere MFI bei weniger Verbrauch an Streptavidin-PE erwarten durfte. Denn ein weiterer Unterschied war, dass die Differenzierung in

niedrige und hohe Signale nochmals deutlicher wurde. Aus diesem Grund fiel die Entscheidung auf Streptavidin-PE des Herstellers Moss in einer Konzentration von 4 ng/ μ l.

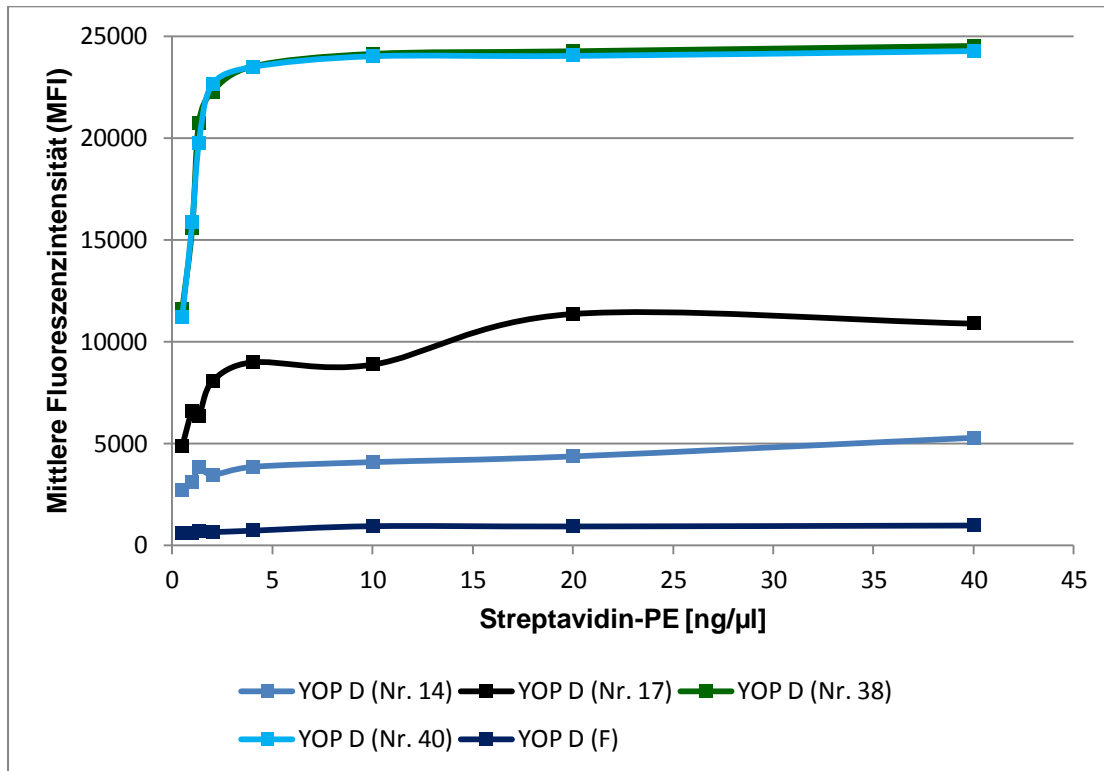


Abbildung 16: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von YopD in Abhängigkeit der Streptavidin-PE-Konzentration (Moss) bei konstanter Biotin-Konzentration im Test mit vier unterschiedlichen porzinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)

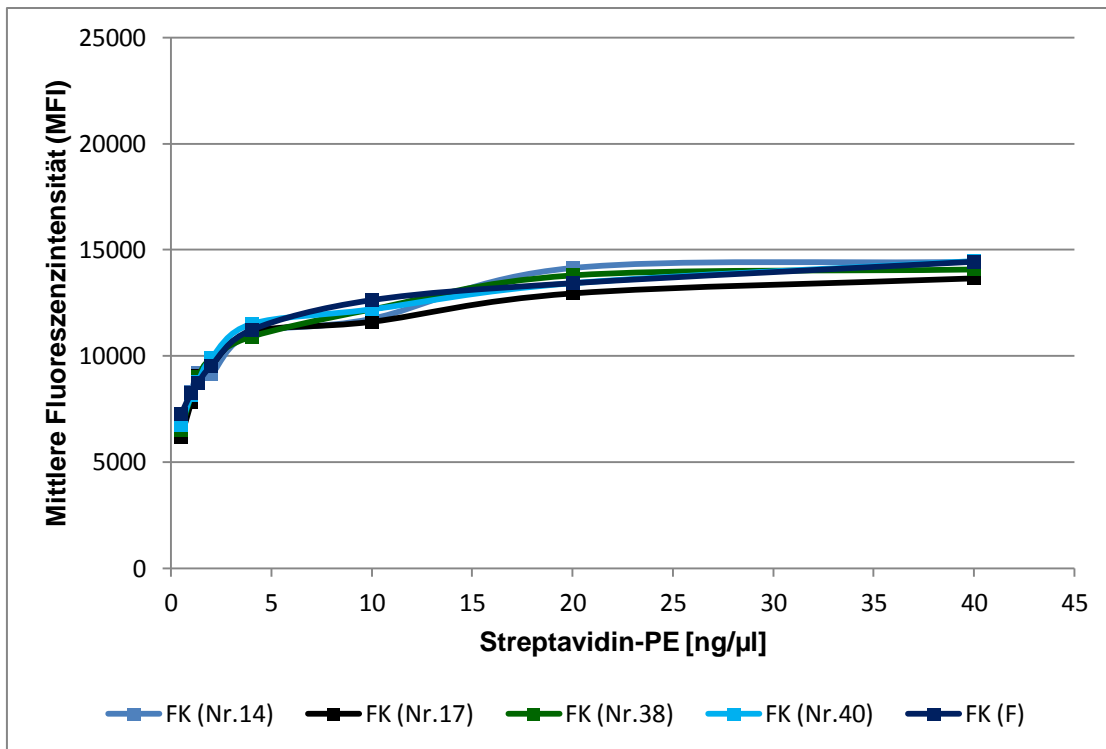


Abbildung 17: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der FK in Abhängigkeit von der Streptavidin-PE-Konzentration (Moss) im Test mit vier unterschiedlichen porzinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)

6.3.5 Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin

Das vom Hersteller Moss hergestellte Anti-Schwein-IgG konjugiert an R-Phycoerythrin wurde ebenfalls in der Verdünnungsreihe mit fünf Seren eingesetzt. Auch hier erfolgte die Auswertung getrennt nach der Signalstärke für YopD und für die FK. Bei YopD konnte bis zu einer Konzentration von 3 ng/μl ein signifikanter Anstieg festgestellt werden. Die Signalstärken fielen jedoch bei höherer Konzentration wieder ab. Alle gemessenen Werte lagen im messbaren Bereich. Hohe und niedrige Messsignale waren klar voneinander abzugrenzen. Das gnotobiotische Ferkel zeigte minimale Signalstärken von unter 150 MFI. Abbildung 18 zeigt die gemessenen MFI-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration von Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin für YopD (Abb. 18).

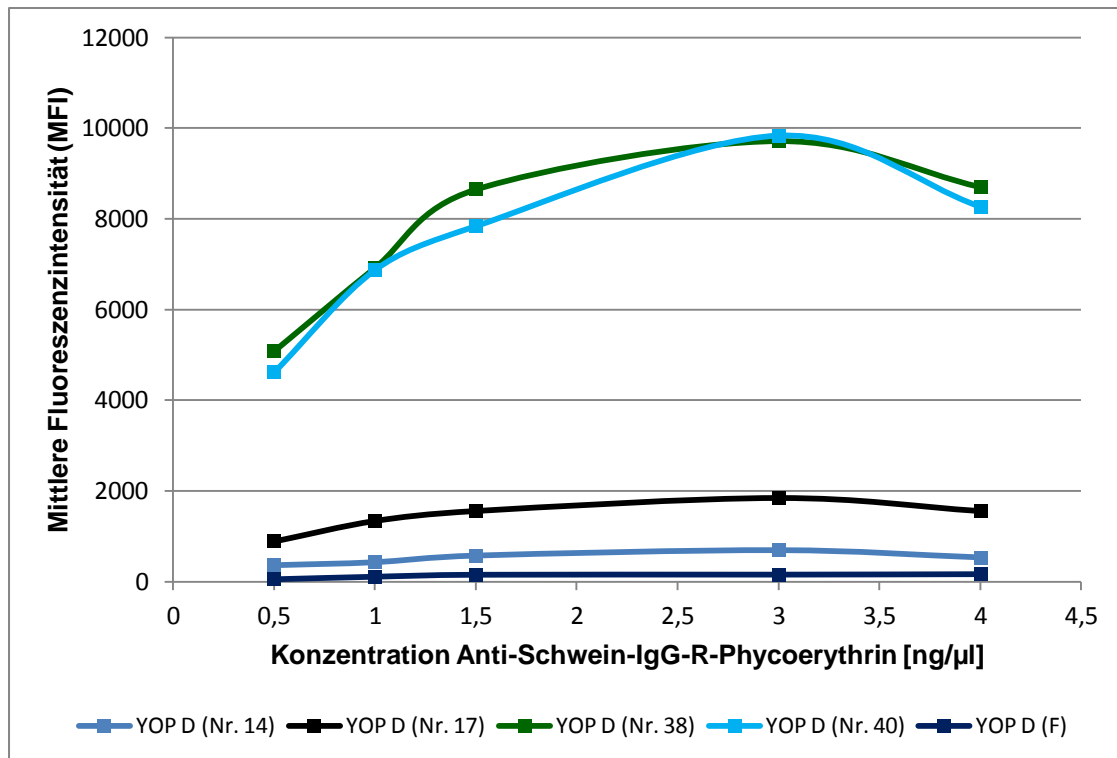


Abbildung 18: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von YopD bei steigenden Konzentrationen von Anti-Schwein-IgG konjugiert an R-Phycoerythrin im Test mit vier unterschiedlichen porzinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)

Auch für die FK wurde das Maximum bei 3 ng/μl erreicht – mit einem anschließenden leichten Abfall. Die absoluten MFI-Werte von um die 8.000 waren im messbaren Bereich und weit oberhalb der Mindestgrenze. Das Verhalten der MFI-Werte bei allen fünf Seren wird in Abbildung 19 gezeigt (Abb. 19). Für Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin wurde somit eine optimale Konzentration von 3 ng/μl bestimmt.

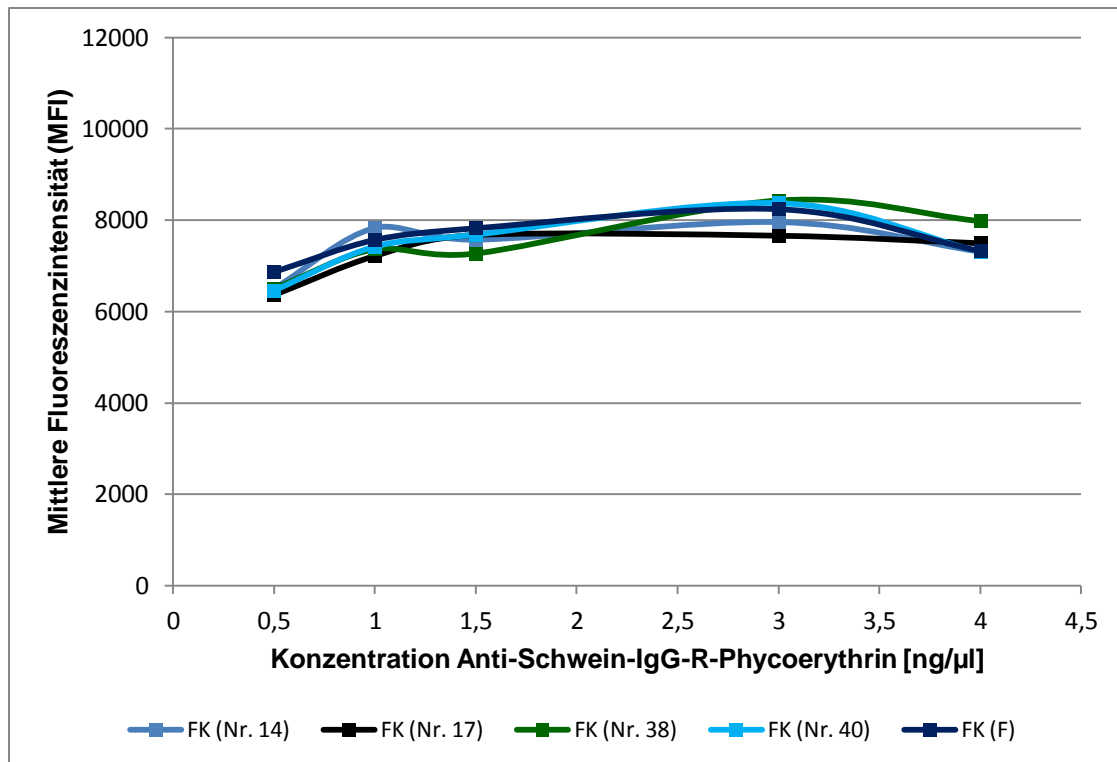


Abbildung 19: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der FK bei steigenden Konzentrationen von Anti-Schwein-IgG konjugiert an R-Phycoerythrin im Test mit vier unterschiedlichen porzinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)

6.3.6 Titration mit Vorinkubation der Detektormoleküle

Ein anderer Lösungsansatz, um die Abarbeitungszeit im Gegensatz zur zweistufigen Abarbeitung bei Einsatz von Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin (Dianova) und Streptavidin-PE (Moss) zu verkürzen, war eine Vorinkubation der beiden miteinander.

Der Versuchsaufbau entsprach erneut einer Schachbrettitration. Dabei war festzustellen, dass es für Streptavidin-PE einen Sättigungsbereich gab. Für Biotin hingegen verhielt es sich anders. Hier war zunächst eine Steigung der MFI-Werte zu erkennen, die aber bei steigender Biotinkonzentration wieder abnahm.

Bei der durchgeführten Schachbrettitration lagen die optimalen Konzentrationen bei 2 ng/μl Biotin sowie 4 ng/μl Streptavidin-PE, sowohl für 30 als auch für 60 min. Dabei zeigte sich, dass die MFI-Werte nach einer durchgeführten Vorinkubation im optimalen Konzentrationsbereich äußerst nahe an denen lagen, die erzielt wurden, als beide Detektormoleküle in nacheinander folgenden Schritten zugesetzt wurden. Bei beiden durchgeführten Vorinkubationen (30 min und 60 min) wurden ähnliche

Messwerte erzielt. Ein Vergleich der MFI-Werte bei den optimalen Konzentrationen in beiden Inkubationszeiten für YopD sowie für die FK wird in den Abbildungen 20 und 21 dargestellt (Abb. 20 und 21).

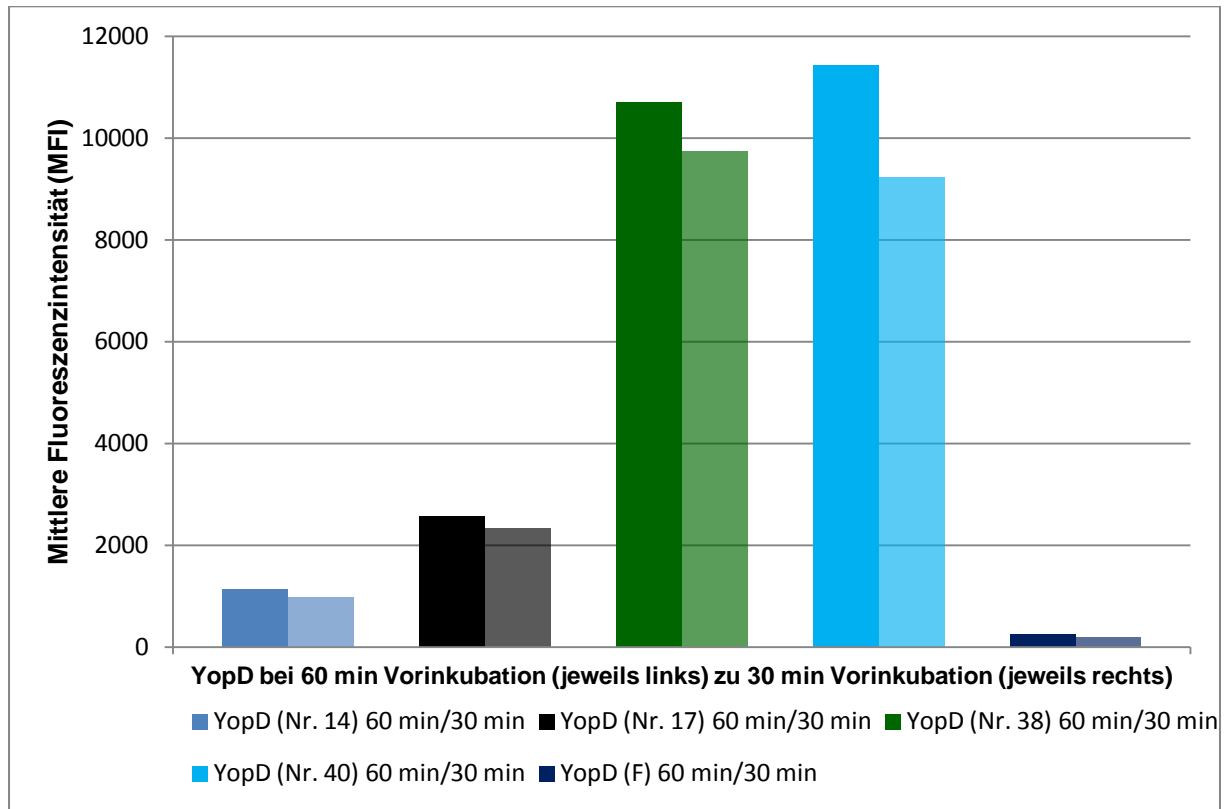


Abbildung 20: Vergleich der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der FK der vier unterschiedlichen porzinen Seren sowie des gnotobiotischen Ferkels (F) bei 60 min Vorinkubation im Vergleich zu 30 min Vorinkubation

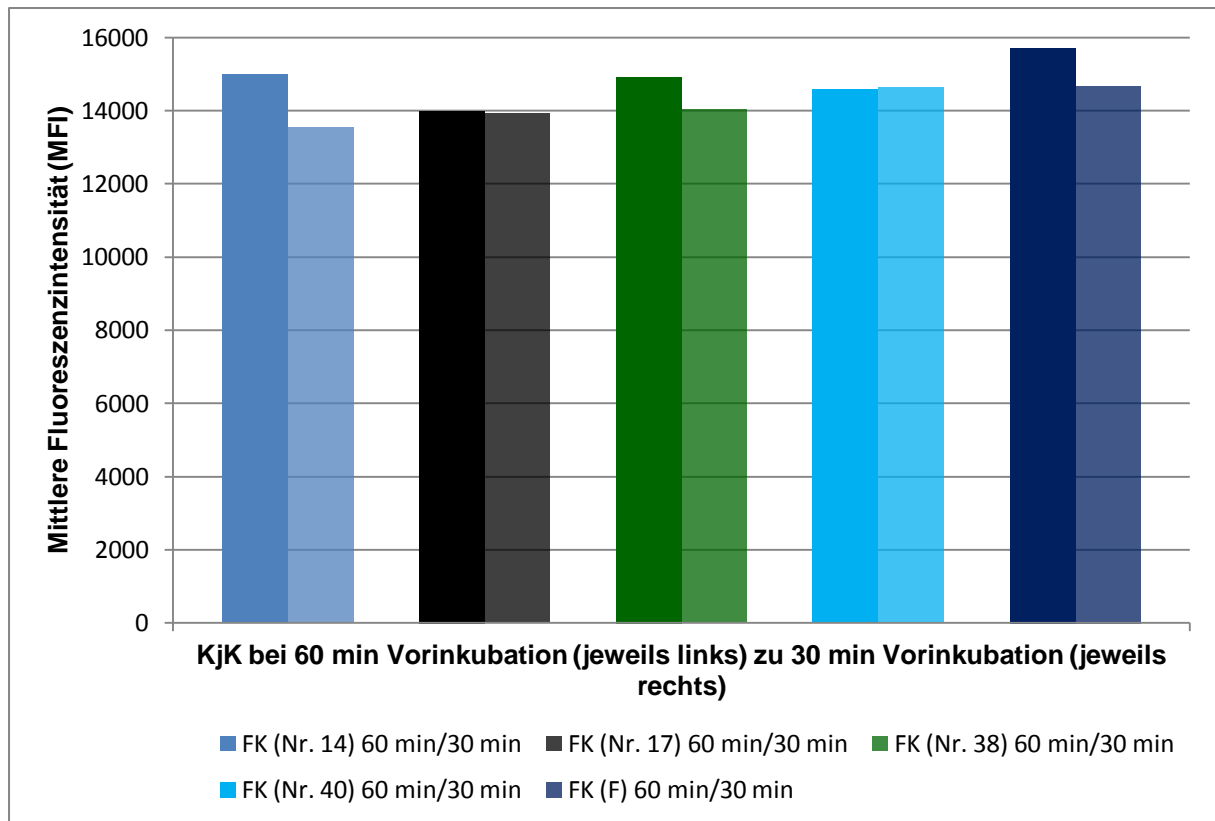


Abbildung 21: Vergleich der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der FK der vier unterschiedlichen porzinen Seren sowie des gnotobiotischen Ferkels (F) bei 60 min Vorinkubation zu 30 min Vorinkubation

6.3.7 Vorinkubation versus Anti-Schwein-IgG-R-Phycoerythrin

Um eine Entscheidung treffen zu können, mit welchen Detektormolekülen in Zukunft gearbeitet werden sollte, wurden die MFI-Werte bei optimaler Konzentration bei Vorinkubation von Biotin (Dianova) und von Streptavidin-PE (Moss) mit den MFI-Werten bei optimaler Konzentration von Anti-Schwein-IgG konjugiert an R-Phycoerythrin (Moss) verglichen. Das Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin wurde demnach in einer Konzentration von 2 ng/μl, das Streptavidin-PE in einer Konzentration von 4 ng/μl eingesetzt. Die optimale Konzentration von Anti-Schwein-IgG konjugiert an R-Phycoerythrin betrug 3 ng/μl. Eine signifikante Differenz der MFI-Werte war für YopD nicht erkennbar. Der maximale Unterschied lag bei 300 MFI. Beim Serum des Ferkels lag die Abweichung unter 50 MFI. Die unterschiedlichen Signalstärken bei beiden Modellen der getesteten fünf Seren ist in Abbildung 22 graphisch dargestellt (Abb. 22).

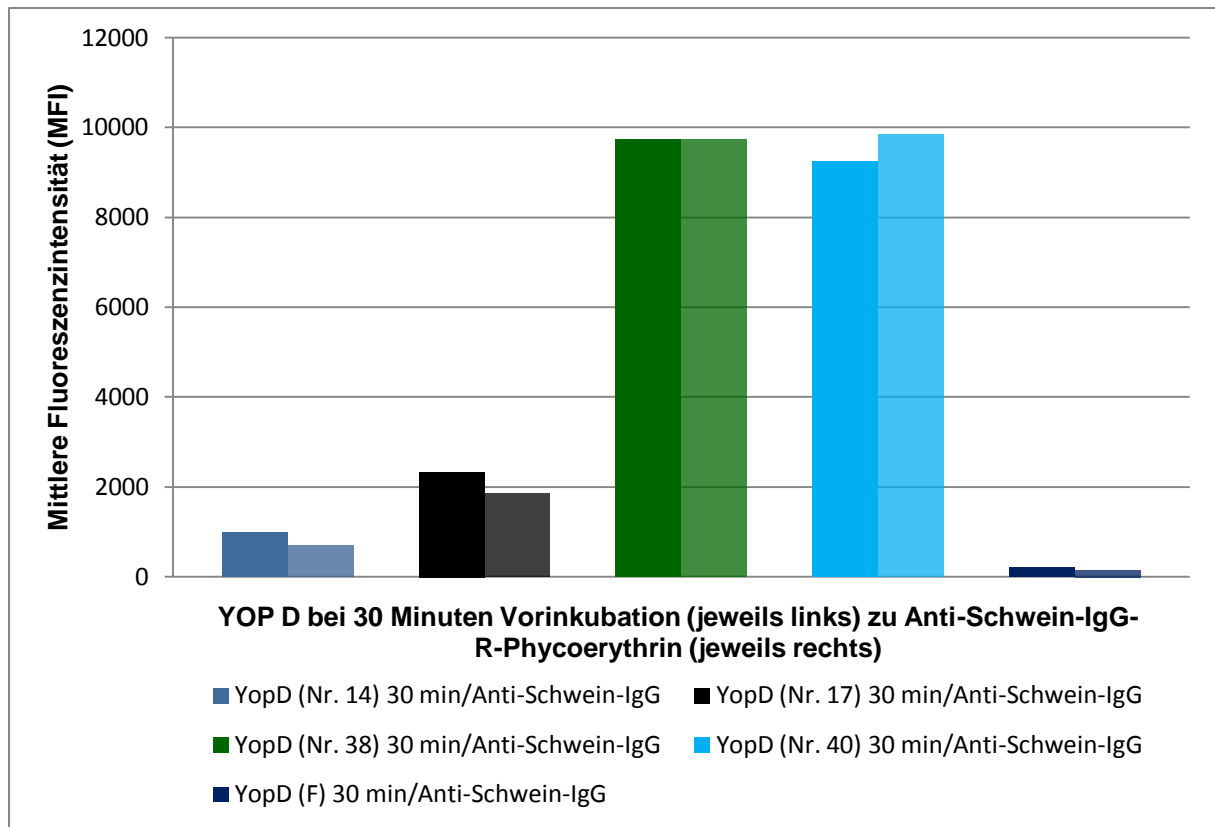


Abbildung 22: Vergleich der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von YopD bei 30 Minuten Vorinkubation von Biotin und Streptavidin-PE im Vergleich zu Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin im Test mit vier unterschiedlichen porzinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)

Im Falle der FK ergaben sich deutlich abweichende Werte. So ergaben sich bei Vorinkubation wesentlich höhere Werte von um die 14.000 MFI, während sich im Falle von Anti-Schwein-IgG konjugiert an R-Phycoerythrin niedrigere Werte um 8.000 MFI messen ließen. Allerdings entsprachen beide Größen den Mindestsignalstärken der FK von über 4.000 MFI. Ein Vergleich der gemessenen MFI der FK wird in Abbildung 23 gezeigt (Abb. 23).

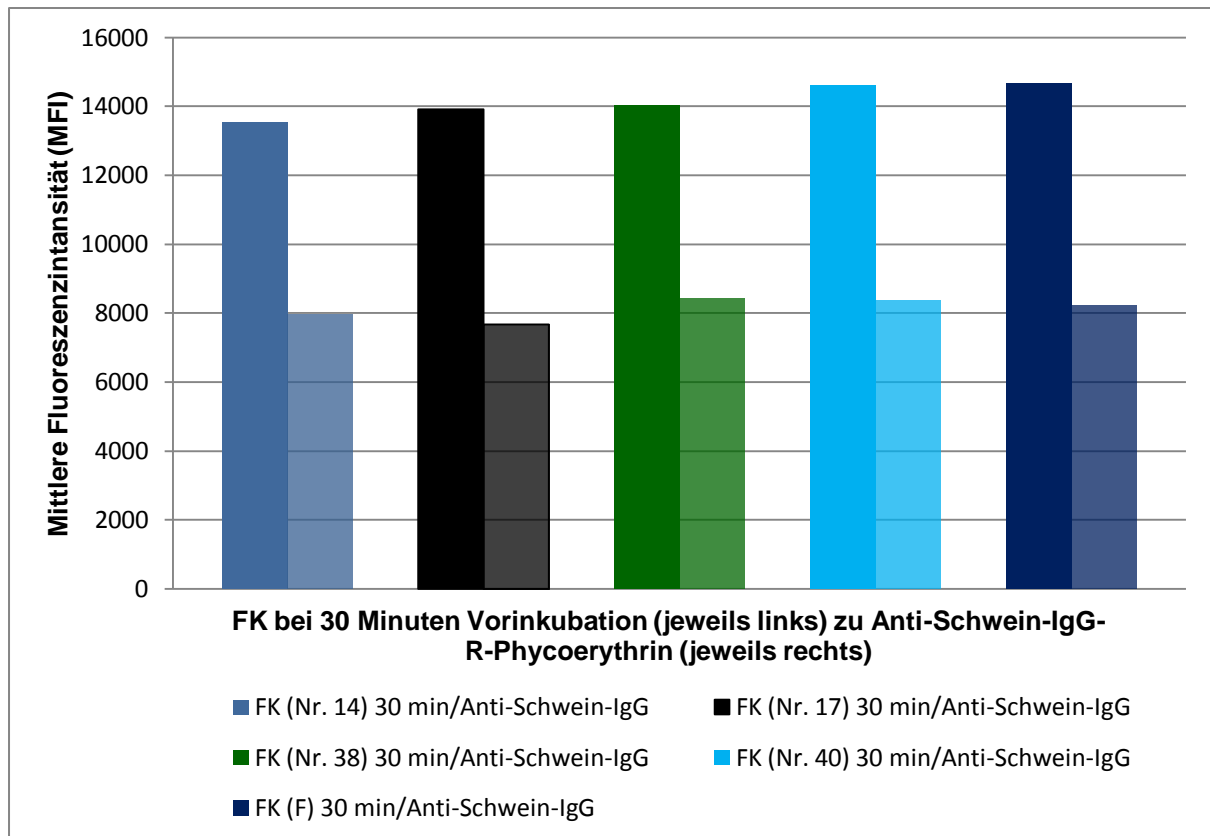


Abbildung 23: Vergleich der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der FK bei 30 Minuten Vorinkubation von Biotin und Streptavidin-PE im Vergleich zu Anti-Schwein-IgG konjugiert mit an R-Phycoerythrin im Test mit viert unterschiedlichen porzinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)

Aufgrund der vergleichbaren Leistung hinsichtlich des Antigens YopD, einer zufriedenstellenden Leistung in Bezug auf die FK und des wesentlich geringeren Arbeitsaufwandes wurde für alle weiteren Versuche Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin (Moss) verwendet.

6.4 EINSTELLUNG DER INKUBATIONSKONTROLLE

Zur Einstellung der Inkubationskontrolle wurden die fünf Seren im Vergleich zu einem Pufferwert an einem Beadmix, welcher die IK in vier verschiedenen Beschichtungskonzentrationen enthielt, getestet. Inkubiert wurde mit Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin (Moss) in einer Konzentration von 3 ng/μl. Man sah, dass sich der Hintergrundwert des Puffers eindeutig vom Wert der IK unterschied. Dieser lag durchgehend unter 500 MFI. Weiterhin war ersichtlich, dass sich mit steigender Beschichtungskonzentration nur irrelevante Steigerungen der IK

von ca. 11.000 auf 14.000 je Serum erzielen ließen (siehe Abbildung 24). Diese waren vernachlässigbar, da die IK lediglich als Kontrolle diente und nur zwischen „Serum zugegeben“ und „kein Serum zugegeben“ unterschieden werden musste, wobei der Pufferwert letzterem entsprach. Die Beschichtungskonzentration von 25 ng/μl wurde für das Testsystem beibehalten.

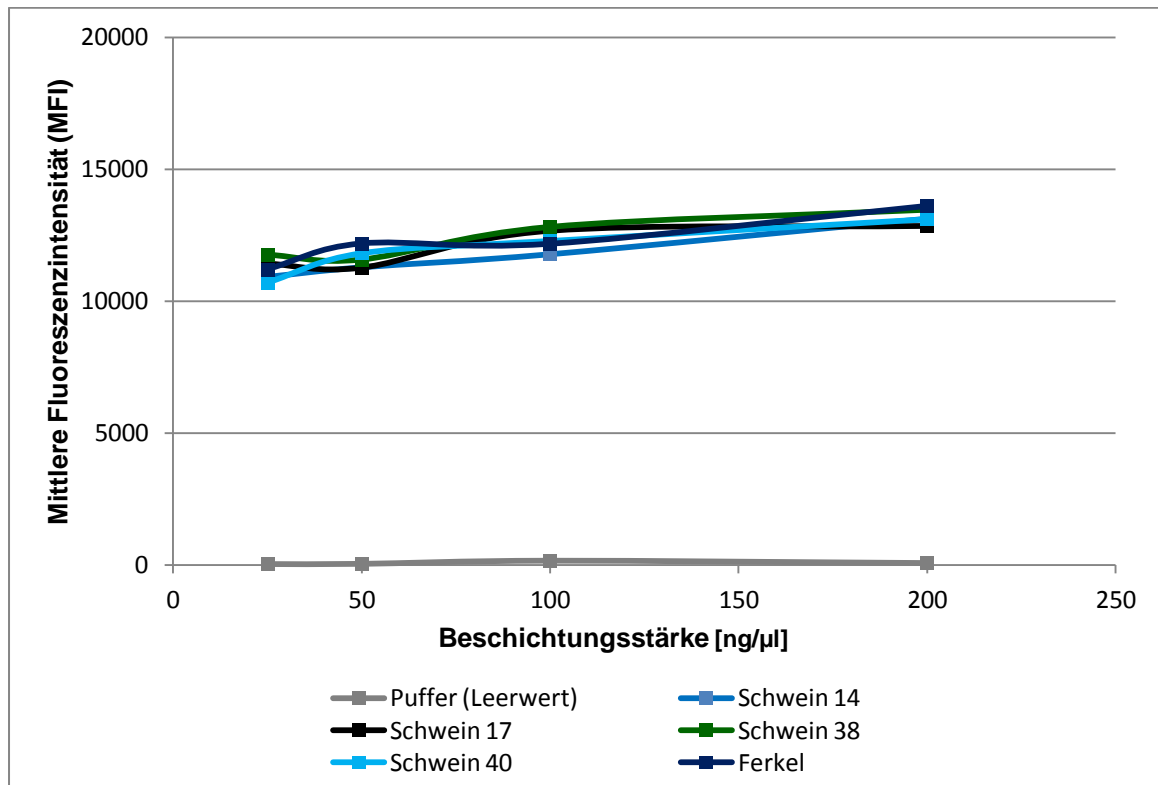


Abbildung 24: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der IK in Abhängigkeit der gekoppelten Beschichtungskonzentration im Test mit vier unterschiedlichen porzinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)

6.5 EINSTELLUNG DER BESCHICHTUNGSKONZENTRATIONEN FÜR YOPH UND YOPN

Aufgrund der biochemischen Eigenschaften zeigte sich bei den Kopplungen von YopH und YopN ein gesteigertes Aggregationsverhalten. So erhielt man weniger gefundene Beads pro Region bei der Messung des Testmixes sowie verlängerte Messzeiten. Für YopH zeigte sich, dass bei 30 ng/μl die einzuhaltende Messzeit von 100 s stets überschritten wurde (Tab. 12). Diese Konzentration konnte damit als zu hoch erachtet werden. Bei 10 ng/μl wurden hingegen sowohl die Laufzeit als auch die Mindestmenge an gemessenen Beads eingehalten (Tab. 13).

Tabelle 12: Ergebnisse des Testmixes für YopH bei einer Beschichtungskonzentration von 30 ng/μl

YopH 30 ng/μl	Laufzeit	Detektierte Beads
Testmix 1	>100 s	25
Testmix 2	>100 s	31
Testmix 3	>100 s	19
Testmix 4	>100 s	26

Tabelle 13: Ergebnisse des Testmixes für YopH bei einer Beschichtungskonzentration von 10 ng/μl

YopH 10 ng/μl	Laufzeit	Detektierte Beads
Testmix 1	56 s	50
Testmix 2	75 s	50
Testmix 3	80 s	50
Testmix 4	64 s	50

Bei YopN zeigte sich, dass bei beiden Konzentrationen sowohl Messzeit als auch Anzahl an Beads eingehalten werden konnten. Allerdings ließen sich mit der höheren Konzentration von 30 ng/μl kürzere Laufzeiten zur Messung der erforderlichen Menge an 50 Beads messen (Tab. 14 und 15).

Tabelle 14: Ergebnisse des Testmixes für YopN bei einer Beschichtungskonzentration von 30 ng/μl

YopN 30 ng/μl	Laufzeit	Detektierte Beads
Testmix 1	41 s	50
Testmix 2	52 s	50
Testmix 3	54 s	50
Testmix 4	49 s	50

Tabelle 15: Ergebnisse des Testmixes für YopN bei einer Beschichtungskonzentration von 10 ng/μl

YopN 10 ng/μl	Laufzeit	Detektierte Beads
Testmix 1	65 s	50
Testmix 2	63 s	50
Testmix 3	87 s	50
Testmix 4	70 s	50

Da bei beiden Antigenen die Ergebnisse den Anforderungen entsprachen, wurde auf eine weitere Veränderung der Beschichtungskonzentrationen verzichtet. Für alle weiteren Kopplungen wurden damit die Beschichtungskonzentrationen von 10 ng/μl für YopH und 30 ng/μl für YopN festgelegt.

6.6 AUSWERTUNG DER SEREN

Nachdem die Rahmenbedingungen nach den vorangegangenen Versuchen bestimmt worden waren, wurden alle 551 Seren im Anschluss an FM 3 getestet. Die MFI-Werte der FK sowie der IK lagen mit über 4.000 bzw. 6.000 MFI in allen Fällen im Sollbereich. Die Zugabe von Serum und Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin war damit bestätigt. Die Auswertung der Seren konnte somit vorgenommen werden.

Die Rohdaten der Messungen wurden in eine Excel Tabelle konvertiert. Aus den gemessenen MFI-Werten wurden in einer weiteren Tabelle zunächst die COI anhand der Formel der Firma Mikrogen für jedes Antigen je Serum berechnet.

Dabei wurde der CO anfangs als Konstante von 10 gewählt. Danach erfolgte eine anfängliche Beurteilung der Antigene nach der Regel, dass jeder COI unter 0,67 als negativ galt, jeder größer gleich 0,67 und kleiner 1 als fraglich sowie größer als 1 als positiv. Diese initiale Beurteilung war nicht als wahr anzusehen, sie diente lediglich als Zwischenschritt. Innerhalb der programmierten Excel Tabelle konnten dabei die Summe der negativen, fraglichen und positiven Ergebnisse für jedes Antigen pro Serum und auch für jedes Serum insgesamt abgelesen werden. Anhand des CO konnten nun für jedes Antigen die Grenzen zu negativ, fraglich und positiv verschoben werden. Ziel dieser statistischen Einstellung war, dass eine

Unterscheidung in negativ und positiv möglichst deutlich sein sollte. Die Zahl an fraglichen Seren sollte, im Umkehrschluss also, so gering wie möglich sein. Durch eine selbst entsprechend programmierte Excel Tabelle konnte dann der CO gefunden werden, der die wenigsten fraglichen Ergebnisse lieferte. Es handelte sich dabei um Werte zwischen 3,9 und 50, je nach Antigen. Die minimale Zahl der fraglichen Resultate je Antigen variierte dabei zwischen 7 und 56. In Tabelle 10 sind die Antigene inklusive ihres CO und ihrer Differenzierung dargelegt (Tab. 16).

Tabelle 16: Ergebnisse der einzelnen Antigene der Seren inklusive ihres Cut-Off und ihrer Differenzierung

Antigen	CO ¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
YopM	35	9	7	535
VAG-A	50	164	45	342
PsaA	12,5	32	27	492
YopD	30	298	7	246
MyfA	3,9	208	20	323
YopE	15	205	46	300
YopH	9	124	56	371
YopN	19	45	29	477

¹CO: Cut-Off

Anhand der Einzelbewertung der Antigene erfolgte die Einteilung in insgesamt positive, fragliche und negative Seren. Mehr als 2 Punkte erhielten 298 der Seren und galten demnach als positiv. Lediglich ein Serum galt als fraglich. Die restlichen 252 Seren waren negativ.

Von den 298 positiven Seren konnten anhand der Kriterien zur Speziesdifferenzierung 173 genauer eingegrenzt werden. Reagierte PsaA größer oder gleich CO und MyfA reagierte kleiner gleich CO, so konnte von einer Infektion mit *Y. pseudotuberculosis* ausgegangen werden. Verhielt es sich exakt umgekehrt und PsaA reagierte bei einem positiven Testergebnis kleiner gleich CO während MyfA größer gleich CO war, so sprach dies für eine *Y. enterocolitica* Infektion. Waren bei

einem positiven Testergebnis weder die einen noch die anderen Kriterien erfüllt, so konnte keine Speziesdifferenzierung vorgenommen werden. 172 Seren wurden danach als *Y. enterocolitica* detektiert. Ein Serum der Tiere, die im Vorfeld mittels PCR positiv auf *Y. pseudotuberculosis* im Kot getestet worden waren, konnte auch im Test als *Y. pseudotuberculosis* differenziert werden. Insgesamt konnten damit 58,1 % der positiven Seren genauer eingegrenzt werden (siehe Anhang).

6.7 REPRODUZIERBARKEIT

Um die erfolgreiche Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden die gewählten 36 Seren auf FM 1, FM 2 und FM 3 getestet. Sie enthielten, wie zuvor beschrieben, sowohl Seren mit hohen Signalstärken (20 Seren) als auch Seren mit Signalstärken, die annähernd denen der Negativkontrolle (16 Seren) entsprachen. Dabei wurde der CO wie oben beschrieben für jedes Funktionsmuster einzeln eingestellt. Ziel innerhalb der Reproduzierbarkeit war, möglichst identische COI der einzelnen Antigene zu erreichen und damit die gleiche Unterscheidung zwischen negativ, fraglich und positiv zu treffen zu können. Abweichungen zwischen den Antigenen der drei Funktionsmuster waren nur geringgradig vorhanden. Am deutlichsten kamen diese bei MyfA und YopH sowie YopN zum Vorschein, deren Einteilung in fraglich um bis zu zwei bzw. vier Einheiten voneinander variierten (siehe Tabellen 17 bis 24).

Tabelle 17: Reproduzierbarkeit von YopM mit Serum

<u>YopM</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	33	6	1	29
FM 2	40	6	0	30
FM 3	35	6	0	30

¹CO: Cut-Off

Tabelle 18: Reproduzierbarkeit von VAG-A mit Serum

<u>VAG-A</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	50	19	1	16
FM 2	45	18	2	16
FM 3	50	18	2	16

¹CO: Cut-Off

Tabelle 19: Reproduzierbarkeit von PsaA mit Serum

<u>PsaA</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	10	7	0	29
FM 2	9	7	1	28
FM 3	12,5	7	0	29

¹CO: Cut-Off

Tabelle 20: Reproduzierbarkeit von YopD mit Serum

<u>YopD</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	30	20	0	16
FM 2	30	20	0	16
FM 3	30	20	0	16

¹CO: Cut-Off

Tabelle 21: Reproduzierbarkeit von MyfA mit Serum

<u>MyfA</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	5	17	0	19
FM 2	5	13	2	21
FM 3	3,9	17	0	19

¹CO: Cut-Off

Tabelle 22: Reproduzierbarkeit von YopE mit Serum

<u>YopE</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	10	20	1	15
FM 2	16	19	1	16
FM 3	15	19	1	16

¹CO: Cut-Off

Tabelle 23: Reproduzierbarkeit von YopH mit Serum

<u>YopH</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	8	14	4	18
FM 2	3,4	13	5	18
FM 3	9	15	3	18

¹CO: Cut-Off

Tabelle 24: Reproduzierbarkeit von YopN mit Serum

<u>YopN</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	18	8	3	25
FM 2	26	5	5	26
FM 3	19	9	1	26

¹CO: Cut-Off

6.8 FLEISCHTROPFSAFTVERDÜNNUNG

Bei den zunächst eingesetzten Verdünnungsstufen von Verdünnungsstufen 5:1, 2,5:1, 1:1, 1:2,5 sowie von purem FTS war eine Austestung nicht möglich. Der Versuch scheiterte bereits bei der Abarbeitung des Testes. Durch die Partikel im FTS wurde ein Absaugen der Mikrofilterplatte auf der Vakuumstation verhindert.

Auch bei den höheren Verdünnungsstufen von 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 und 1:80 verstopfte die Mikrofilterplatte. Zwar war das reguläre Durchführen der Testabarbeitung möglich, jedoch war es dem Analysegerät fast ausnahmslos nicht möglich, über 50 Beads pro Region zu finden. Hier konnten je Antigen nur zwischen 0 und 70 Beads gefunden werden, insbesondere bei den Yop-Antigenen gingen die gefundenen Mikrosphären allerdings gegen Null. Die einzuhaltende Maximalmesszeit von 100 s wurde bei jeder Messung überschritten. Tabelle 25 zeigt beispielhaft die gefundenen Beads pro Region eines zufällig gewählten FTS in den verschiedenen Verdünnungsstufen (Tab. 25).

Tabelle 25: Gefundene Beads pro Region beispielhaft anhand eines zufällig gewählten Fleischtropfsaftes in den verschiedenen Verdünnungsstufen

		Gefundene Beads pro Region							
		YopM	PsaA	MyfA	YopD	VAG-A	YopE	YopH	YopN
Verdünnung	1:5	1	1	0	2	1	2	0	0
	1:10	3	12	9	0	4	3	2	2
	1:20	5	17	28	3	10	5	0	6
	1:40	10	33	36	16	27	26	8	12
	1:80	14	59	41	26	39	58	28	30

Es erfolgte anschließend die Versuchsreihe mit zentrifugierten, gefilterten sowie zentrifugierten und gefilterten Fleischtropfsaftproben für die Verdünnungen 1:20 und 1:40. Auch hier konnte in den Verdünnungsstufen 1:20 und 1:40 keine adäquate Messung durchgeführt werden. Allerdings fand das Analysesystem im Unterschied zum vorherigen Versuch zumeist zwischen 10 und ca. 180 Beads.

In den Verdünnungsstufen 1:80 und 1:160 wurde mit allen drei Methoden erreicht, dass stets über 50 Beads im erforderlichen Intervall von 100 s gemessen werden

konnten. Dabei unterschieden sich die Anzahl der gemessenen Beads pro Region kaum. Auch die MFI-Werte zeigten keinen signifikanten Unterschied. Tabelle 26 zeigt beispielhaft die gefundenen Beads pro Region eines zufällig gewählten FTS in den verschiedenen Verdünnungsstufen nach Zentrifugation, Filtration bzw. nach Zentrifugation und Filtration (Tab. 26). Für die Abarbeitung mit FTS wurde eine Verdünnung von 1:100 nach der Zentrifugation der Probe für 10 min bei maximaler Umdrehung und 20 °C ausgewählt.

Tabelle 26: Gefundene Beads pro Beadregion im Test mit einer beispielhaft gewählten Fleischtropfsaftprobe in den verschiedenen Verdünnungsstufen nach Zentrifugation, Filtration bzw. nach Zentrifugation und Filtration

			Gefundene Beads pro Beadregion							
			YopM	PsaA	MyfA	YopD	VAG-A	YopE	YopH	YopN
Verdünnung	Z ¹	1:20	15	111	95	23	112	13	13	12
		1:40	40	144	138	70	154	41	59	58
		1:80	50	129	117	87	155	59	84	76
		1:160	69	96	71	69	69	71	107	74
	F ²	1:20	15	118	111	24	137	15	16	14
		1:40	34	160	159	66	175	36	53	44
		1:80	50	140	130	94	144	71	88	102
		1:160	50	64	50	64	71	68	70	64
	Z&F ³	1:20	14	99	88	17	91	11	13	12
		1:40	31	131	136	44	174	32	38	39
		1:80	40	151	146	101	183	62	86	73
		1:160	56	86	72	67	89	74	86	77

¹Z: Zentrifugation

²F: Filtration

³Z&F: Zentrifugation und Filtration

6.9 AUSWERTUNG DES FTS

Die MFI-Werte der IK lagen durchschnittlich etwa 1.000 MFI geringer als bei der Austestung mit Serum. Sie lagen damit insgesamt aber, wie auch die FK, durchweg im Soll von über 6.000 MFI. Zugabe von FTS und Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin waren so bestätigt. Auch die Mindestanzahl an gemessenen Beads pro Region wurde eingehalten. Die Auswertung der FTS konnte somit vorgenommen werden.

Die Rohdaten wurden erneut in eine Excel Tabelle konvertiert. Aus diesen wurde analog zum Serum in einer neuen Tabelle der COI zunächst mit einem CO von je 10 berechnet. Anschließend wurde dieser analog dem Verfahren bei Serum statistisch eingestellt. Es ergaben sich dabei für den Beadmix von FM 3 im Test mit FTS die in Tabelle 27 beschriebenen Werte (Tab. 27).

Tabelle 27: Ergebnisse der einzelnen Antigene für Fleischtropfsaft inklusive ihres Cut-Off und ihrer Differenzierung

Antigen	CO ¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
YopM	40	0	1	367
VAG-A	33	20	12	334
PsaA	12,5	2	0	366
YopD	11,6	164	18	186
MyfA	2,2	92	18	258
YopE	45	1	1	366
YopH	40	0	0	368
YopN	40	0	0	368

¹CO: Cut-Off

Anhand der Einzelbewertung der Antigene erfolgte die Einteilung in insgesamt positiv, fraglich und negativ. Mehr als 2 Punkte erhielten 164 der Fleischtropfsaftproben und galten demnach als positiv. Keine der Proben galt als fraglich. Demnach waren die restlichen 204 als negativ zu erachten.

Von den 164 positiven Fleischsäften konnten nach den Kriterien zur Speziesdifferenzierung (analog zur Differenzierung der Seren) 85 genauer eingegrenzt werden. Alle dieser 85 wurden als *Y. enterocolitica* diskriminiert. Insgesamt konnten damit 51,8 % der positiven Fleischtropfsaftproben genauer eingegrenzt werden (siehe Anhang).

6.10 REPRODUZIERBARKEIT

Alle genannten 24 Fleischtropfsaftproben wurden auf FM 1, FM 2 und FM 3 getestet. Abweichungen zwischen den Funktionsmustern waren, wie auch im Test mit Serum, nur geringgradig vorhanden. Die nachfolgenden Tabellen Nr. 28 bis 35 zeigen die Auswertungen der einzelnen Funktionsmuster nach CO, Anzahl positiv, fraglich und negativ (Tab. 28 bis 35).

Tabelle 28: Reproduzierbarkeit von YopM mit Fleischtropfsaft

<u>YopM</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	40	0	0	24
FM 2	40	0	0	24
FM 3	40	0	0	24

¹CO: Cut-Off

Tabelle 29: Reproduzierbarkeit von VAG-A mit Fleischtropfsaft

<u>VAG-A</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	28	10	1	13
FM 2	26	10	1	13
FM 3	33	10	0	14

¹CO: Cut-Off

Tabelle 30: Reproduzierbarkeit von PsaA mit Fleischtropfsaft

<u>PsaA</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	35	0	0	24
FM 2	15	0	0	24
FM 3	12,5	0	0	24

¹CO: Cut-Off

Tabelle 31: Reproduzierbarkeit von YopD mit Fleischtropfsaft

<u>YopD</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	12	16	0	8
FM 2	8	16	0	8
FM 3	11,6	16	0	8

¹CO: Cut-Off

Tabelle 32: Reproduzierbarkeit von MyfA mit Fleischtropfsaft

<u>MyfA</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	10	13	2	9
FM 2	1,1	13	0	11
FM 3	2,2	13	0	11

¹CO: Cut-Off

Tabelle 33: Reproduzierbarkeit von YopE mit Fleischtropfsaft

<u>YopE</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	40	1	0	23
FM 2	55	1	0	23
FM 3	55	1	0	23

¹CO: Cut-Off

Tabelle 34: Reproduzierbarkeit von YopH mit Fleischtropfsaft

<u>YopH</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	50	0	0	24
FM 2	40	0	0	24
FM 3	40	0	0	24

¹CO: Cut-Off

Tabelle 35: Reproduzierbarkeit von YopN mit Fleischtropfsaft

<u>YopN</u>	CO¹	Anzahl (n)		
		positiv	fraglich	negativ
FM 1	40	0	0	24
FM 2	40	0	0	24
FM 3	40	0	0	24

¹CO: Cut-Off

7 REFERENZMETHODE

Alle 551 Seren wurden im PIGTYPE[®] YOPSCREEN ELISA (QIAGEN Leipzig GmbH) getestet. Die Negativkontrollen waren dabei in Doppelbestimmung stets unterhalb einer OD kleiner gleich 0,3. Auch die Positivkontrollen wurden bei jeder Platte in Doppelbestimmung mitgeführt und lagen immer deutlich über der geforderten OD von größer gleich 0,7. Auch alle 368 Fleischtropfsaftproben wurden im ELISA mit voller Gültigkeit getestet.

Von den getesteten Seren waren im ELISA 299 positiv, die restlichen 252 Seren dementsprechend negativ. Eine Speziesdifferenzierung oder die Bestimmung einzelner Antigene war mittels des Testsystems nicht möglich. 173 der Fleischtropfsaftproben waren als positiv zu beurteilen, die restlichen 195 Proben als negativ (siehe Anhang).

8 SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

8.1 SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT FÜR SERUM

Beim Vergleich der Ergebnisse des *recomBead Yersinia pig* und des PIGTYPE® YOPSCREEN ELISA ergaben sich im Serum insgesamt neun abweichende Proben. Dies entsprach einem Prozentsatz von 1,63 %. Zur genaueren Differenzierung hinsichtlich falsch positiv und falsch negativ erfolgte die Bestimmung von Sensitivität und Spezifität. Der ELISA wurde dabei als Referenzmethode geführt. Im Falle der Sensitivität erhielt man im *recomBead Yersinia pig* vier falsch negative Seren sowie ein falsch fragliches (siehe auch Anhang). Dies entsprach bei einer Gesamtzahl von 299 positiven Seren einer Sensitivität von 98,3 %.

Von den 252 negativen Seren wurden im *recomBead Yersinia pig* vier Seren als falsch positiv getestet. Kein Serum war falsch fraglich (siehe auch Anhang). Damit lag die Spezifität bei 98,4 %. Die Einteilung in negativ, fraglich und positiv sowie daraus resultierend Sensitivität und Spezifität können aus Tabelle 36 entnommen werden (Tab. 36).

Tabelle 36: Sensitivität und Spezifität des *recomBead Yersinia pig* im Vergleich zum PIGTYPE® YOPSCREEN als Referenzmethode im Test mit Serum

Serum	Prüfmethode (<i>recomBead Yersinia pig</i>)			
		Positiv	Negativ	Summe
Referenzmethode (PIGTYPE® YOPSCREEN)	Positiv	294	4 (+1 fragliches)	299
	Negativ	4	248	252
	Sensitivität	98,3 %	Spezifität	98,4 %

8.2 SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT FÜR FTS

Auch für die Testung von FTS wurden Sensitivität und Spezifität ermittelt. Die erzielten Ergebnisse lagen unter denen von Serum mit 13 abweichenden Proben von insgesamt 368 Proben, dies entspricht 3,5 %. Die Sensitivität lag mit elf falsch

negativen von 173 positiven Fleischtropfsaftproben bei 93,6 %. Nur zwei der 195 negativen Fleischtropfsaftproben erhielten im *recomBead Yersinia pig* ein falsch positives Ergebnis, keine ein falsch fragliches. Damit lag die erreichte Spezifität bei 99,0 % (siehe auch Anhang). Anhand der Gesamtzahl der Proben sowie deren Ergebnis im *recomBead Yersinia pig* können aus Tabelle 37 Sensitivität und Spezifität entnommen werden (Tab. 37).

Tabelle 37: Sensitivität und Spezifität des *recomBead Yersinia pig* im Vergleich zum PIGTYPE® YOPSCREEN als Referenzmethode im Test mit Fleischtropfsaft

Fleischtropfsaft	Prüfmethode (<i>recomBead Yersinia pig</i>)			
		Positiv	Negativ	Summe
Referenzmethode (PIGTYPE® YOPSCREEN)	Positiv	162	11	173
	Negativ	2	193	195
	Sensitivität	93,6 %	Spezifität	99,0 %

V DISKUSSION

9 RECOMBEAD YERSINIA PIG

Der *recomBead Yersinia pig* ist nach eigenem Wissen der erste Assay dieser Art innerhalb der Veterinärmedizin. Aktuell kann daher auf keine vergleichende Literatur zurück gegriffen werden, weshalb die in einer Monographie übliche Gegenüberstellung der eigenen Ergebnisse zu denen anderer Studien entfällt.

9.1 HERSTELLUNG DES ASSAYS

Die Herstellung der Beadmixe erfolgte nach dem bereits evaluierten Schema des *recomBead Yersinia human*. Dazu wurden die einzelnen Kopplungschargen je Beadregion zunächst im Testmix hinsichtlich der Beschichtungsstärke überprüft. Daraufhin wurde die Zusammenstellung des Beadmixes anhand eines firmeninternen Berechnungsprotokolls festgelegt und der jeweilige Beadmix hergestellt. Alle drei derart produzierten Funktionsmuster erfüllten die anschließende Leistungsbewertung im Test mit dem humanen Prüfpanel. Die nicht anhand des humanen Prüfpanels überprüfbare IK überzeugte sowohl im Testmix als auch im Test mit Schweineserum und speziesspezifischem Sekundärantikörper als Detektormolekül. Lediglich für YopH und YopN konnte nach dem Testmix nur die Aussage getroffen werden, dass die Kopplung erfolgreich war. Hinsichtlich der Reaktivität jener beiden Antigene konnte keine sichere Bestätigung erreicht werden, da diese im humanen Prüfpanel nicht enthalten sind. Die Sicherstellung ihrer Reaktivität erfolgte anhand der Auswertung der Feldproben sowie des zusammengestellten porzinen Prüfpanels.

9.2 EINSTELLUNG DER DETEKTORMOLEKÜLE

In einem Vorversuch im *recomLine Yersinia human* wurden vordefinierte Schweineseren der Firma Mikrogen getestet. Dies war von Vorteil bei der Einstellung der Detektormoleküle. Denn obwohl jenes Testsystem nicht auf Schweineseren eingestellt war und damit kein exaktes Ergebnis abzulesen war, war äußerst auffällig, dass YopD in der Mehrheit der Fälle ein deutlich positives Signal lieferte. So konnten die Signalstärken von positiven als auch von negativen Seren grob abgegrenzt

werden. Zudem war dies wichtig, um den Sättigungsbereich eines Detektormoleküles einschätzen zu können.

Diese Voraussetzungen lieferten die Basis zur Titration der Detektormoleküle. Für Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin konnte ab einer Konzentration von 1 ng/µl von Beginn an deutliche Sättigungskurven im Bereich der Messgrenze erreicht werden. Bei Streptavidin-PE zeigten sich allerdings Reaktivitätsunterschiede. Streptavidin-PE von Invitrogen führte im Vortest zwar zu einer Sättigungskurve oberhalb der geforderten Mindestsignalstärke von 4.000 MFI, diese lag mit ca. 6.000 MFI allerdings nur geringgradig darüber. Aus der Erfahrung mit anderen Beadassays war bekannt, dass die Fluoreszenzsignale während der Lagerung um 1.000 bis 2.000 MFI sinken können. Aufgrund dieser Gefahr, dass es dadurch zu ungültigen Beadassays kommen könnte, wurde der Versuch mit Streptavidin-PE zweier weiterer Hersteller wiederholt. Mit Streptavidin-PE von Prozyme und Moss konnten Sättigungskurven mit deutlich höheren MFI-Werten von ca. 12.000 bzw. 14.000 MFI erzielt werden. Aus diesem Grund wurden nur diese in den Versuch mit Serum mit einbezogen. Hierbei fiel auf, dass man bei Streptavidin-PE des Herstellers Moss höhere MFI-Werte bei weniger Verbrauch erwarten durfte. Ein Sättigungsbereich trat bei 4 ng/µl ein. Weiterer Vorteil war, dass die Unterscheidung in niedrige und hohe Signale nochmals deutlicher wurde. Aus diesem Grund fiel die Entscheidung auf das Streptavidin-PE von Moss.

Nachteil des Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin bzw. Streptavidin-PE ist, dass die Testabarbeitung in zwei Stufen erfolgen muss. Beide müssen einzeln inkubiert werden, getrennt durch einen Waschschrift. Dies kann im *recomBead Yersinia human* umgangen werden, da hier ein Anti-human-IgG Antikörper, konjugiert mit R-Phycoerythrin, erhältlich ist. Das Pendant dazu stellte der Hersteller Moss auf Nachfrage her. Im Versuch konnte gezeigt werden, dass mit diesem Anti-Schwein-IgG konjugiert an R-Phycoerythrin bei einer optimalen Konzentration von 3 ng/µl hohe und niedrige Messsignale klar voneinander abgegrenzt werden können. Die Signalstärken lagen stets im erforderlichen Bereich.

Alternative zu Letzterem bot die Vorinkubation des Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin und des Streptavidin-PE. Dadurch wird während der Testabarbeitung eine einstufige Inkubation ermöglicht. Es erfolgte erneut ein Titrationsversuch. Dabei war festzustellen, dass es für Streptavidin-PE einen Sättigungsbereich gab. Dies war

dadurch zu erklären, dass ab einem bestimmten Zeitpunkt alle Bindungen zu Biotin besetzt waren und bei erneuter Zugabe von Streptavidin-PE keine weiteren Bindungen entstehen konnten. Aus diesem Grund fand keine weitere Signalerhöhung statt. Für Biotin hingegen verhielt es sich anders. Hier folgte einem gewissen Sättigungsbereich eine leichte Abnahme der Signalstärke bei Steigerung der Biotinkonzentration. Mögliche Erklärung hierfür ist, dass während der Vorinkubation Biotin und Streptavidin-PE aneinander banden. Wenn es zu einem Biotinüberschuss kam, blieben nach der Vorinkubation weitere Biotinmoleküle übrig. Da die gebundenen Komplexe aber nicht von freien Antikörpern durch einen Waschschrift getrennt wurden, sondern nun zusammen zum Serum gegeben wurden, konnten nun auch Anti-Schwein-IgG konjugiert mit Biotin, welches nicht mit Streptavidin-PE reagiert hatte, mit Probenantikörpern binden. Dadurch waren Bindungsstellen besetzt, es kam aber zu keinem Fluoreszenzsignal. Die MFI-Werte sanken deshalb bei Biotinüberschuss oberhalb der Sättigungsgrenze. Optimale Ergebnisse wurden bei einer Biotin Konzentration von 2 ng/µl sowie einer Streptavidin-PE Konzentration von 4 ng/µl erreicht. Sowohl bei einer Vorinkubation von 30 als auch von 60 min konnten so Signalstärken erzielt werden, die nahezu identisch zu jenen der zweistufigen Inkubation waren. Damit kann eine Vorinkubation von 30 min als ausreichend erachtet werden.

Im Vergleich von Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin zur Vorinkubation von Biotin und Streptavidin-PE war kaum eine Differenz der MFI-Werte für YopD erkennbar. Im Falle der FK ergaben sich deutlich abweichende Werte. So ergaben sich bei Vorinkubation wesentlich höhere Werte von um die 14.000 MFI, während sich im Falle von Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin niedrigere Werte um 8.000 MFI messen ließen. Allerdings entsprachen beide Größen den erwünschten Vorgaben der Mindestsignalstärken der FK von über 4.000 MFI inklusive einer Sicherheitsspanne von 1.000 bis 2.000 MFI.

Als beste Variante erwies sich Anti-Schwein-IgG konjugiert mit R-Phycoerythrin durch die Einsparung an Arbeitsaufwand bei vergleichbaren Kosten sowie der Annahme, dass dieses in gleichbleibender Reaktivität und Qualität beim Hersteller Moss bezogen werden kann. Eine Vorinkubation scheint ebenfalls möglich zu sein. Allerdings fehlen hierzu Daten zu Stabilität und Lagerung.

9.3 EINSTELLUNG DER INKUBATIONSKONTROLLE

Zur Einstellung der Inkubationskontrolle wurden fünf Seren im Vergleich zu einem Pufferwert an einem Beadmix getestet. Der Beadmix enthielt die IK in vier verschiedenen Beschichtungskonzentrationen, beginnend mit 25 ng/µl. Man sah, dass sich der Hintergrundwert des Puffers mit 500 MFI eindeutig vom Wert der IK unterschied. Weiterhin war ersichtlich, dass sich mit steigender Beschichtungskonzentration nur irrelevante Steigerungen der IK von ca. 11.000 MFI auf 14.000 je Serum erzielen ließen. Diese waren vernachlässigbar, da die IK lediglich als Kontrolle diente und nur zwischen „Serum zugegeben“ und „kein Serum zugegeben“ unterschieden werden musste, wobei der Pufferwert letzterem entsprach. Man konnte daraus also folgern, dass man sich bereits bei einer Beschichtungskonzentration von 25 ng/µl in ausreichender Sättigung befand.

9.4 ANTIGENE YOPH UND YOPN

Die Antigene YopH und YopN ließen sich aufgrund ihrer aggregierenden Eigenschaften weniger gut koppeln als die restlichen Antigene. Diese Tatsache war zum einen aus firmeninternen Vorversuchen ersichtlich, zum anderen war festzustellen, dass es im Testmix bei beiden Antigenen regelmäßig zu verlängerten Laufzeiten bzw. zu wenig gefundenen Beads kam. Diese Problematik zeigte sich auch in ihrer Reproduzierbarkeit. Ursache der Aggregation sind insbesondere die sich bildenden Disulfidbrücken. Aufgrund dessen, dass die Kopplung beider Antigene schließlich erfolgreich war, beide also im Testmix die geforderten Grenzbereiche einhielten, wurde darauf verzichtet, näher zu erörtern wie sich diese aggregierende Eigenschaft reduzieren ließe. Ein möglicher Lösungsansatz hierfür wäre allerdings die Veränderung des Puffers während der Dialyse der Antigene, z.B. durch den Zusatz von Dithiothreitol (DDT), da DDT die Oxidation von Sulfhydryl-Gruppen zu Disulfidbrücken verhindern kann.

Im *recomBead* *Yersinia human* sind die Antigene YopH und YopN nicht enthalten. Dementsprechend enthielt auch das humane Prüfpanel keine Werte bezüglich jener Antigene. So blieb eine Beurteilung der Reaktivität zunächst fraglich. Anhand der Auswertungstabellen der Seren und Fleischtropfsaftproben konnte man allerdings feststellen, dass YopH oftmals hohe Ausschläge zeigte. Allerdings nur dann, wenn auch bei YopD hohe Signale zu sehen waren. War YopD negativ, so war dies auch

YopH (siehe Anhang). Da YopD als Markerantigen gehandhabt wird und das Tier damit automatisch als positiv gilt wenn YopD positiv ist, bringt das Antigen YopH keine neuen Informationen mehr. Allerdings könnte es dazu dienen, die Diagnose abzusichern. YopN reagiert unspezifisch bei Seren, die durch YopD ohnehin als klar positiv eingestuft wurden. Seine Aussagekraft ist fraglich. Es stellt sich daher die Frage, ob es sich überhaupt empfiehlt, YopH und YopN im *recomBead Yersinia pig* mitzuführen.

9.5 AUSWERTUNG DES ASSAYS

Erster Schritt der Auswertung war die Einstellung der CO-Werte. Da hierfür ein definiertes Panel an Schweineseren fehlte, erfolgte diese nach statistischen Methoden mittels ROC Analyse. Die Grundvoraussetzung hierfür – eine genügend große Stichprobe – wurde mit den vorhandenen 551 Serumproben bzw. 368 Proben erreicht. Anschließend wurden mittels einer in Excel programmierten Tabelle CO-Werte berechnet, bei denen sich eine größtmögliche Unterscheidung in positive und negative Proben mit einer möglichst geringen Anzahl an fraglichen Ergebnissen ergab. Im zweiten Schritt wurden die Ergebnisse mit denen des ELISA verglichen und damit die Einstellung des CO kontrolliert. Nach der Einstellung der CO-Werte konnte anhand der COI-Werte die Beurteilung der einzelnen Antigene erfolgen. Jeder COI unter 0,67 galt als negativ, jeder größer gleich 0,67 und kleiner 1 als fraglich sowie jeder größer als 1 als positiv.

Zunächst fand die Einstellung der einzelnen Antigene für jedes Serum bzw. jede Fleischtropfsaftprobe in positiv, fraglich und negativ statt. Anschließend erfolgte die Einteilung des ganzen Serums bzw. der Fleischtropfsaftprobe in *Yersinia* positiv, fraglich oder negativ. Dies erfolgte nach dem System des bereits zugelassenen *recomBead Yersinia human*. Dabei wurden alle positiven Antigene bis auf YopD einfach gezählt. YopD hingegen wurde aufgrund seiner Eigenschaft als Markerantigen dreifach gezählt. Ein Serum bzw. FTS wurde als *Yersinia*-positiv erachtet, wenn die Punktzahl größer als 2 war. Bei 2 Punkten handelte es sich um ein fragliches Serum. Werte darunter galten als negativ. Die Speziesdifferenzierung folgte analog den im *recomBead Yersinia human* geltenden Richtlinien: War das Testergebnis positiv, PsaA reagierte größer oder gleich CO und MyfA reagierte kleiner gleich CO, so konnte von einer Infektion mit *Y. pseudotuberculosis*

ausgegangen werden. Verhielt es sich exakt umgekehrt und PsaA reagierte bei einem positiven Testergebnis kleiner gleich CO während MyfA größer gleich CO war, so sprach dies für eine *Y. enterocolitica* Infektion. Waren bei einem positiven Testergebnis weder die einen noch die anderen Kriterien erfüllt, so konnte keine Speziesdifferenzierung vorgenommen werden.

Dieses Auswertungsregime wird von der Firma Mikrogen im zugelassenen *recomBead* Yersinia human erfolgreich eingesetzt. Dennoch lässt sich nicht mit Sicherheit sagen, dass es für porcine Proben gleichwertig verlässliche Ergebnisse hervorbringt. Es beruht auf der Annahme, dass bei einer positiven Probe stets eine Serokonversion bei YopD zu finden ist. Sobald YopD positiv ist, wird die ganze Probe durch die Vergabe von drei Punkten als positiv deklariert. Diese These wird von den Untersuchungen mit porcinen Proben gestützt. Es finden sich dort, wenn YopD negativ ist, nur in Ausnahmen andere fragliche oder, noch seltener, positive Antigene. So reagierten innerhalb der 246 Seren, bei denen YopD negativ war, nur 0,8 % der anderen Antigene als fraglich und 0,6 % als positiv. Unter ihnen ließ sich keine Häufung bezüglich eines bestimmten Antigens finden.

Bei Fleischtropfsaft reagierte bei keiner Probe ein Antigen als fraglich oder positiv, wenn YopD negativ war (siehe Anhang). Durch diesen Aspekt erscheint das für humane Proben einheitliche Punktesystem auch für porcine Proben anwendbar. Allerdings wird die Frage aufgeworfen, inwieweit das Vorhandensein der anderen Antigene im Testsystem Sinn macht.

MyfA und PsaA sind unabdingbar aufgrund ihrer Fähigkeit, zwischen *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* zu differenzieren. Sie reagieren – mit 1,6 % abweichenden Proben – nur positiv, wenn auch YopD positiv ist (siehe Anhang). Dies spricht gegen eine falsche Speziesdifferenzierung des Assays. Ebenso, dass stets nur eines von beiden Antigenen reagiert.

Für die anderen Antigene lässt sich bei den porcinen Proben bislang keine gesicherte Funktion darlegen. Eine Möglichkeit wäre, dass sie Auskunft geben könnten, wie schwer die Infektion mit Yersinien verlief und wie lange sie her ist. Leider fehlen dazu verlässliche Daten zum Verlauf des Immunitätsstatus hinsichtlich Art und Menge der Antikörper nach durchlaufener Yersiniose beim Schwein. Aus humanen Studien ist bekannt, dass beim Mensch bereits während einer akuten

Yersiniose IgM-, IgA- und meist auch schon IgG-Antikörper nachweisbar sind. IgM- und IgA-Antikörper gehen innerhalb von 3-6 Monaten im Verlauf der Infektion zurück, während IgG-Antikörper in der Regel mindestens 5 Monate bis hin zu Jahren persistieren (HOOGKAMP-KORSTANJE et al., 1992).

9.6 REPRODUZIERBARKEIT

Ziel der Reproduzierbarkeitsstudie war, möglichst identische COI der einzelnen Antigene der drei Funktionsmuster zu erreichen, um damit die Unterscheidung zwischen negativ, fraglich und positiv zu treffen zu können. Abweichungen zwischen den Antigenen der drei Funktionsmuster waren nur geringgradig vorhanden. Am deutlichsten kamen diese bei MyfA und YopH sowie YopN zum Vorschein, deren Einteilung in fraglich in FM 2 um bis zu zwei bzw. vier Einheiten voneinander variierten. Diese drei Antigene weisen durch ihre Fragilität bzw. durch ihr gesteigertes Aggregationsverhalten schlechtere Kopplungseigenschaften auf. Insgesamt ließ sich allerdings feststellen, dass die Kopplung aller Antigene reproduzierbar war.

9.7 FLEISCHTROPFSAFTVERDÜNNUNG

Die bei der Firma Mikrogen bis dato entwickelten Beadassays waren alle auf eine Anwendung mit Serum ausgelegt (Firma Mikrogen, 2011, mündliche Information). So bildete der Einsatz von FTS eine Herausforderung. Unzentrifugierter bzw. ungefilterter FTS verklumpte die feine Filtermembran der Testplatten sofort und machte die Abarbeitung des Testes bereits beim ersten Waschschrift unmöglich. Sowohl eine Filtration als auch eine Zentrifugation erwiesen sich als verlässliche Methoden, um größere Moleküle vom restlichen FTS zu trennen. Aufgrund der Kosten für Filterspitzen und der gleichen Erfolgsrate wie bei Zentrifugation fiel die Entscheidung auf die alleinige Zentrifugation für 10 min bei maximaler Umdrehung bei 20 °C. Durch die Trennung von größeren Molekülen konnten die Proben im Anschluss verdünnt eingesetzt werden. Sowohl eine Verdünnung von 1:80 als auch von 1:160 war komplikationslos messbar. Aus praktischen Gründen wurde eine Verdünnung von 1:100 gewählt, da sie das Pipettieren erleichterte.

10 UNTERSUCHUNG DER FELDPROBEN

10.1 ERGEBNISSE DER PROBEN

Abzüglich der bereits zuvor vorhandenen 44 Seren der Firma Mikrogen wurden im Rahmen der Arbeit 507 Serumproben und 368 Fleischtropfsaftproben aus bayerischen Schlachthöfen auf enteropathogene Yersinien getestet. Initial wurde angestrebt, die jeweils zusammengehörenden Serum- und Fleischtropfsaftproben im Vergleich zu untersuchen; dies konnte aber aufgrund der Möglichkeiten im Schlachthof nicht eingehalten werden. Aufgrund dessen erfolgte die Testeinstellung für Serum und FTS unabhängig voneinander. Dabei wurden im *recomBead Yersinia pig* innerhalb der Serumproben 256 Proben als positiv detektiert, 1 Probe als fraglich und 250 Proben als negativ. Das entspricht einer Antikörperprävalenz von 50,5 %. Innerhalb der Fleischtropfsaftproben wurden 164 Proben als positiv getestet sowie 204 als negativ. Kein FTS galt als fraglich. Die Prävalenz von Antikörpern im FTS lag damit bei 44,6 %.

Die Daten des *recomBead Yersinia pig* sind vergleichbar mit der Auswertung der Proben im validierten und vom FLI zugelassenen Referenztest, dem PIGTYPE® YOPSCREEN ELISA. Hier liegt die Prävalenz im Serum bei 50,9 %, im FTS bei 47,0 %.

10.2 PRÄVALENZ IN VERGLEICHBAREN STUDIEN

Im Jahr 2004 wurden zwei Studien publiziert, die sich ebenfalls mit der Antikörperprävalenz in Serum- bzw. Fleischtropfsaftproben von Schlachtschweinen in Bayern befasst haben. Darin wurden bei 65,7 % der Tiere Antikörper im Serum gemessen (BARTLING et al., 2004). Im FTS lag die Prävalenz bei 45,0 % (HENSEL et al., 2004). Während also die Ergebnisse bei FTS ähnliche Werte liefern, liegt die Prävalenz der Serumproben, die in dieser Arbeit ermittelt wurde, um rund 15 % unter jener der früheren Studie. Allerdings gilt es zu beachten, dass in der Studie von BARTLING et al. nur das Vorhandensein von Antikörpern gemessen wurde (BARTLING et al., 2004). Antikörper gegen YopD hatten in dieser mittels Western Blot durchgeführten Studie nur 52,3 % der Tiere und damit vergleichbar viele wie im *recomBead Yersinia pig*.

10.3 VORKOMMEN DER ERREGER IN ANDEREN STAATEN

Auch in anderen europäischen Mitgliedsstaaten besteht seit langem ein Interesse am Vorkommen von *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* bei Schlachtschweinen. Die hier erhobenen Daten basieren in der Regel allerdings nicht auf serologischen Nachweismethoden, sondern auf den Nachweis von vermehrungsfähigen Erregern in den Tonsillen der Tiere mittels PCR. Das sichert zwar, dass zum Zeitpunkt der Probenahme eine akute Infektion stattfand, allerdings fallen Tiere nach einer durchlaufenen Infektion damit durch das Raster. In einer solchen Studie in Dänemark waren 25 % der Tiere hinsichtlich *Y. enterocolitica* positiv (ANDERSEN et al., 1991). Ebenfalls *Y. enterocolitica* positiv waren 56 % der Schlachtschweine in Finnland, 93 % in Spanien, 44 % in Belgien und 32 % in Italien (KORTE et al., 2004; MARTINEZ et al., 2011). Hohe Werte konnten auch auf dem Baltikum gemessen werden. So fand man bei 89 % der Schlachtschweine in Estland und 64 % in Lettland *Y. enterocolitica* in den Tonsillen (MARTINEZ et al., 2009). Ein vergleichbar hoher Wert mit 88 % konnte in einem Schweizer Schlachthof gemessen werden (FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007). In Bezug auf *Y. pseudotuberculosis* lässt sich auf deutlich weniger Literatur zurück greifen. Aber auch hier existieren Zahlen zum Vorkommen in den europäischen Staaten. Während der Erreger bei 2 % bzw. 1 % der beprobten Tiere in Belgien und Italien vorkam, konnte er in spanischen Schlachthöfen nicht gefunden werden (MARTINEZ et al., 2011). Die Studie innerhalb der baltischen Staaten wertete die Proben ebenfalls hinsichtlich *Y. pseudotuberculosis* aus. Hier betrug die Isolationsrate 5 % in Lettland und 1 % in Estland. Besonders zu betonen an dieser Studie ist, dass bei einem der Tiere in Lettland eine Doppelinfektion mit beiden enteropathogenen Yersinien nachgewiesen werden konnte (MARTINEZ et al., 2009).

Es ist zu erkennen, dass die publizierten Zahlen je nach Land teils deutlich variieren. In allen Studien kommt *Y. enterocolitica* jedoch wesentlich häufiger vor als *Y. pseudotuberculosis*. Die Ergebnisse im recomBead Yersinia pig liegen, verglichen mit den Werten aus den genannten anderen Staaten, damit im Erwartungsfeld.

11 SPEZIESDIFFERENZIERUNG

Ein wichtiges Ziel der Arbeit war eine serologische Speziesdifferenzierung zwischen *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis*, da diese bisher mit kommerziell

erhältlichen serologischen Testsystemen nicht möglich war. Von 298 im Beadtest positiv getesteten Seren konnten 173 Seren einer Spezies zugeordnet werden; das entspricht einem Prozentsatz von 58,0 %. Dabei handelte es sich um 172 *Y. enterocolitica* positive Seren sowie ein *Y. pseudotuberculosis* positives Serum. Beim FTS wurden 164 als positiv getestet, von denen 85 *Y. enterocolitica* zugeordnet werden konnten, das entspricht einer Differenzierungsquote von 51,8 %. Kein FTS wurde als *Y. pseudotuberculosis* positiv differenziert. Diese Daten dienen allerdings lediglich einer Evaluierung des Testsystems. Um epidemiologisch aussagekräftige Werte zu erhalten, wäre zunächst eine Validierung des Testsystems notwendig.

Zur Speziesdifferenzierung werden die Antigene MyfA und PsaA benutzt. Das Protein MyfA ist eine von drei Untereinheiten des nur bei *Y. enterocolitica* vorkommenden Myf Proteins und im Gegensatz zu MyfB und MyfC besitzt es eine bisher einzigartige Struktur (IRIARTE et al., 1993). Analog zum Myf Protein wird von *Y. pseudotuberculosis* das Protein PsaA kodiert (YANG et al., 1996). Durch die Einzigartigkeit dieser beiden Proteine wird erst eine Speziesdifferenzierung ermöglicht. Allerdings sind es auch genau diese zwei Proteine, die höhere Anforderungen an die Kopplung fordern. Insbesondere MyfA zeigt sich in firmeninternen Versuchen nach der Dialyse zum Teil fragil und so kann es zu Abweichungen kommen, die man bei der geringeren Reproduzierbarkeit mit Serum im FM 2 deutlich erkennen kann.

12 SENSITIVITÄT UND SPEZIFITÄT

Sensitivität und Spezifität übertreffen mit 98,3 % sowie 98,4 % für Serum die angestrebten Werte des *recomBead Yersinia human* von 95,9 % bzw. 97,8 %. Auch für FTS ließen sich hohe Werte erzielen. So lag die Sensitivität bei 93,6 %, die Spezifität bei 99,0 %. Fast alle falsch positiven und falsch negativen Ergebnisse lagen im Grenzbereich.

13 VOR- UND NACHTEILE IM VERGLEICH ZUR REFERENZMETHODE

Im Vergleich mit dem PIGTYPE® YOPSCREEN ELISA (QIAGEN Leipzig GmbH) bietet der *recomBead Yersinia pig* einige Vorteile. Aufgrund von hohen Signalstärken wird im Beadtest ein deutlich kleineres Probevolumen als im ELISA benötigt. Während im Beadtest nur 50 µl einer 1:200 verdünnten Serumprobe benötigt

werden, sind dies im ELISA 100 µl einer 1:100 verdünnten Probe. Deutlich größer ist der Unterschied im FTS. Im Gegensatz zum Beadtest, bei welchem lediglich 50 µl einer Fleischropfsaftverdünnung von 1:100 gebraucht werden, schreibt das Protokoll des ELISA 100 µl einer 1:10 verdünnten Probe vor. Die Verdünnung im Beadassay beträgt bei FTS folglich das Zehnfache des ELISA. Außerdem gibt die Analyse nach einzelnen Beads die Möglichkeit, eine Aussage der Antikörper je individuellem Antigen treffen zu können. Die Interpretation dieser Ergebnisse erfordert allerdings noch weitere Studien im Bereich der Immunologie nach durchlaufener Yersiniose beim Schwein. Aufgrund dessen, dass im Beadtest keine Kontrollen in extra Wells mitgeführt werden müssen, können vier Proben pro Testplatte mehr, also 96, gleichzeitig abgearbeitet werden.

Abarbeitung und Handling des Testes sind ähnlich unkompliziert wie bei einem ELISA. Die Zeitintervalle von der Herstellung der Verdünnung bis zur Auswertung sind mit ca. drei Stunden bei beiden Testsystemen vergleichbar. Allerdings dauert die Messung im Analysesystem mit einer bis zweieinhalb Stunden deutlich länger. Sie ist beim ELISA in der Regel innerhalb von weniger als zehn Minuten durchführbar. Insgesamt braucht die Abarbeitung und Auswertung des *recomBead Yersinia pig* ca. doppelt so lange wie beim PIGTYPE® YOPSCREEN ELISA. Hinzu kommt, dass zur Anwendung von Beadtesten, die auf dem Luminex xMAP® System basieren, die entsprechenden Laborgeräte vorhanden sein müssen. Dazu zählt zum einen eine Vakuumstation für Mikrofilterplatten, als auch das Analysegerät mit entsprechender Auswertungssoftware. Dies ist momentan nur größeren Laboren vorbehalten und würde für kleinere Institute nicht geringe Anschaffungskosten bedeuten.

In der Regel wird ein Beadtest als Bestätigungstest für einen ELISA herangezogen (VIGNALI, 2000). Die besondere Eigenschaft des Beadassay, zwischen *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* zu unterscheiden, welche dem PIGTYPE® YOPSCREEN ELISA fehlt, könnte dies jedoch in Frage stellen. Denn diese Aussagekraft kann den *recomBead Yersinia pig* als Screeningtest für die Lebensmittelsicherheit interessant gestalten. Grundvoraussetzung hierfür wären eine anschließende Studie zur Validierung des Beadtestes sowie ein Zulassungsverfahren am Friedrich-Löffler-System.

14 SCHLUSSFOLGERUNG UND AUSBLICK

Enteropathogene Yersinien stellen ein ernst zu nehmendes Problem für die Lebensmittelsicherheit dar. Im Sinne des Verbraucherschutzes wäre es deshalb in Erwägung zu ziehen, eine Testung von Schlachtschweinen, ähnlich wie im Rahmen der Schweine-Salmonellen-Verordnung (SchwSalmoV), hinsichtlich *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* durchzuführen. Mit dem *recomBead Yersinia pig* ist ein neuartiges und effizientes Testsystem im Bereich der Veterinärmedizin entwickelt worden, das für einen solchen Einsatz geeignet wäre.

Bis jetzt gab es für den Nachweis von enteropathogenen Yersinien aus Serum oder FTS von Schlachtschweinen lediglich den ELISA der Firma QIAGEN Leipzig GmbH. Dieser kann allerdings nicht zwischen den beiden Erregern *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* unterscheiden. Mit der Entwicklung des *recomBead Yersinia pig* hingegen wird jene Differenzierung möglich, die insbesondere für folgende Prävalenzstudien von großem Interesse sein dürfte.

Bei den verwendeten Seren und Fleischtropfsaftproben handelt es sich um Stichproben aus südbayerischen Schlachthöfen. Es handelt sich deshalb nicht um eine repräsentative Prävalenzstudie. Allerdings zeigen sich gewisse Häufungen von meist zehn bis 20 nacheinander beprobten Tieren, die zusammenhängend als negativ bzw. positiv getestet wurden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass Schweine aus einem Betrieb auch im Schlachthof zeitgleich geschlachtet werden. Es stellt sich daher die Frage nach dem Vorhandensein yersinienfreier Bestände. Diese Möglichkeit bestätigt auch die Probenahme von 50 Seren aus einem Schlachthof, bei denen kein einziges positives Tier nachgewiesen werden konnte (siehe Anhang). Zwar gibt es bis jetzt einzelne Prävalenzstudien, allerdings sind diese meist nur regional begrenzt und können keinen Zusammenhang zu den Mastbetrieben herstellen (BARTLING et al., 2004; BUCHER et al., 2008; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2001a; FREDRIKSSON-AHOMAA et al., 2007; HENSEL et al., 2004). Für konkretere Aussagen sind daher weiterführende Prävalenzstudien unerlässlich. Eine Validierung des Beadassays muss in weiterführenden Studien mit definierten Seren durchgeführt werden.

Diese erfolgreiche experimentelle Studie zur Entwicklung des *recomBead Yersinia pig* stellt ein schnelles Nachweissystem zum Nachweis relevanter Zoonoseerreger im

Bereich der Lebensmittelsicherheit dar. Weiterhin denkbar wären die Ausarbeitung eines IgM Testes zur Diagnose von akut infizierten Tieren oder die Entwicklung des Testsystems im Hinblick auf andere Spezies wie z.B. Wildschweine oder Wiederkäuer.

VI ZUSAMMENFASSUNG

Bisherige Testformate zum Nachweis von Antikörpern gegen enteropathogene *Yersinia* spp. bei Schweinen konnten lediglich eine Aussage darüber treffen, ob eine Infektion stattgefunden hat, jedoch nicht darüber, welcher der beiden Erreger, *Y. enterocolitica* bzw. *Y. pseudotuberculosis*, die Infektion verursachte. Ziel der Arbeit war daher die Entwicklung eines Immunoassays auf Basis der Beadtechnologie, der Serum und Fleischtropfsaft (FTS) von Schlachtschweinen sowohl als positiv bzw. negativ klassifizieren kann, als auch gezielt zwischen *Y. enterocolitica* und *Y. pseudotuberculosis* differenziert.

551 Serum- sowie 368 Fleischtropfsaftproben wurden mit dem im Rahmen der Arbeit entwickelten *recomBead Yersinia pig Assay* (Firma Mikrogen, Neuried, Deutschland), der die rekombinant hergestellten Antigene YopD, YopE, YopH, YopM, YopN, MyfA, PsaA und VAG-A enthält, gegen einen Referenztest, den PIGTYPE® YOPSCREEN ELISA (QIAGEN Leipzig GmbH, Leipzig, Deutschland) auf IgG Antikörper gegen Yersinien getestet. Verglichen mit dem ELISA zeigte der Beadassay im Serum eine Sensitivität von 98,3% und eine Spezifität von 98,4 %. Für FTS lagen Sensitivität und Spezifität bei 93,6 % bzw. 99,0 %.

Von 307 im Beadtest positiv getesteten Seren konnten 180 Seren einem Erreger zugeordnet werden; das entspricht einem Prozentsatz von 58,6 %. Dabei handelte es sich um 179 *Y. enterocolitica* positive Seren sowie ein *Y. pseudotuberculosis* positives Serum. Beim FTS wurden 164 als positiv getestet, von denen 85 dem Erreger *Y. enterocolitica* zugeordnet werden konnten, das entspricht einer Differenzierungsquote von 51,8 %. Kein FTS wurde als *Y. pseudotuberculosis* positiv differenziert.

Dies ist die erste Evaluierung eines Testsystems zum Nachweis von Antikörpern gegenüber beiden enteropathogenen *Yersinia*-Spezies sowie der Fähigkeit einer gleichzeitigen Erregerdifferenzierung. Der entwickelte Beadassay eignet sich zum Nachweis von Antikörpern aus Blut- und Fleischtropfsaftproben von Hausschweinen.

VII SUMMARY

Evaluation of a microsphere immunoassay for the detection of enteropathogenic *Yersinia* spp. in slaughter pigs

So far, immunoassays for the detection of antibodies against enteropathogenic *Yersinia* spp. in pigs could only indicate whether an infection has occurred but could not differentiate between the two enteropathogenic species, *Yersinia* (*Y.*) *enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*, respectively. Thus, the aim of the present study was to develop a microsphere immunoassay for the detection of antibodies in serum and meat-juice samples and for differentiation between anti-*Y. enterocolitica* and anti-*Y. pseudotuberculosis* antibodies, respectively.

551 sera and 368 meat-juice samples were tested for IgG antibodies against *Yersinia* with the newly developed *recomBead Yersinia* pig (Mikrogen GmbH, Neuried, Germany), which contains recombinantly produced antigens YopD, YopE, YopH, YopM, YopN, MyfA, PsaA and VAG-A. The results were compared to a reference test, PIGTYPE YOPSCREEN® ELISA (QIAGEN GmbH, Leipzig, Germany). Compared to the reference method, the microsphere immunoassay showed a sensitivity of 98.3% and a specificity of 98.4% in serum. For meat-juice, sensitivity and specificity were 93.6% and 99.0%, respectively.

Of 307 sera which tested anti-*Yersinia* positive in the microsphere immunoassay, 180 sera (179 anti-*Y. enterocolitica* and one anti-*Y. pseudotuberculosis* positive sera) could be assigned to one species, representing a percentage of 58.6%. Using meat-juice, 164 samples tested anti-*Yersinia* positive, of which 85 could be assigned to anti-*Y. enterocolitica* IgG, which corresponds to a differentiation rate of 51.8%. Neither of the meat-juice samples could be differentiated as anti-*Y. pseudotuberculosis* IgG positive.

This is the first evaluation of a microsphere immunoassay for the detection of antibodies against the two enteropathogenic *Yersinia* species and for simultaneous species identification. Also, the developed immunoassay is suitable for the detection of antibodies against enteropathogenic *Yersinia* in blood and meat-juice samples of domestic pigs.

VIII LITERATURVERZEICHNIS

- ABDEL-HAQ, N.M., PAPADOPOULOS, R., ASMAR, B.I., BROWN, W.J., 2006. Antibiotic Susceptibilities of *Yersinia Enterocolitica* Recovered from Children over a 12-Year Period. International journal of antimicrobial agents 27, 449-452.
- ALEKSIC, S., 1995. Occurrence of *Y. Enterocolitica* Antigens O:3, O:9 and O:8 in Different *Yersinia* Species, Their Corresponding H Antigens and Origin. Contributions to microbiology and immunology 13, 89-92.
- ALEKSIC, S., BOCKEMÜHL, J., 1996. Untersuchungen Von *Yersinia*-Stämmen Aus Deutschland, 1993-1994. Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz 3, 94-97.
- ALEKSIC, S., BOCKEMÜHL, J., 1990. Microbiology and Epidemiology of *Yersinia* Infections. Immunität und Infektion 18, 178-185.
- ANDERSEN, J.K., SORENSEN, R., GLENSBJERG, M., 1991. Aspects of the Epidemiology of *Yersinia Enterocolitica*: A Review. International journal of food microbiology 13, 231-237.
- BARAKAT, R.K., HARRIS, L.J., 1999. Growth of *Listeria Monocytogenes* and *Yersinia Enterocolitica* on Cooked Modified-Atmosphere-Packaged Poultry in the Presence and Absence of a Naturally Occurring Microbiota. Applied and environmental microbiology 65, 342-345.
- BARTLING, C., TRUYEN, U., ISA, G., NEUBAUER, H., 2004. The Prevalence of *Yersinia*-Specific Antibodies in Cattle in Bavaria. Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift 117, 499-507.
- BERG, J.M., TYMOCZKO, J.L., STRYER, L., 2013. Biochemie. Springer Spektrum, Heidelberg.
- BERGMAN, T., HAKANSSON, S., FORSBERG, A., NORLANDER, L., MACELLARO, A., BACKMAN, A., BOLIN, I., WOLF-WATZ, H., 1991. Analysis of the V Antigen Lcrgh-Yopbd Operon of *Yersinia Pseudotuberculosis*: Evidence for a Regulatory Role of Lcrh and Lcrv. Journal of bacteriology 173, 1607-1616.
- BEST, L.M., VELDHUYZEN VAN ZANTEN, S.J., BEZANSON, G.S., HALDANE, D.J., MALATJALIAN, D.A., 1992. Serological Detection of *Helicobacter Pylori* by a Flow Microsphere Immunofluorescence Assay. Journal of clinical microbiology 30, 2311-2317.
- BEUSCHER, H.U., RODEL, F., FORSBERG, A., ROLLINGHOFF, M., 1995. Bacterial Evasion of Host Immune Defense: *Yersinia Enterocolitica* Encodes a Suppressor for Tumor Necrosis Factor Alpha Expression. Infect Immun 63, 1270-1277.
- BHADURI, S., TURNER-JONES, C., CONWAY, L.K., 1988. Stability of the Virulence Plasmid in *Yersinia Enterocolitica* at Elevated Temperatures. Food Microbiology 5, 231-233.
- BIAGINI, R.E., SAMMONS, D.L., SMITH, J.P., MACKENZIE, B.A., STRILEY, C.A., SEMENOVA, V., STEWARD-CLARK, E., STAMEY, K., FREEMAN, A.E., QUINN, C.P., SNAWDER, J.E., 2004. Comparison of a Multiplexed Fluorescent Covalent Microsphere Immunoassay and an Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for Measurement of Human Immunoglobulin G Antibodies to Anthrax Toxins. Clinical and diagnostic laboratory immunology 11, 50-55.
- BLEYMÜLLER, J., 2012. Statistik Für Wirtschaftswissenschaftler, Vol 16. Vahlen, München, 246 p.

- BLISKA, J.B., CLEMENS, J.C., DIXON, J.E., FALKOW, S., 1992. The *Yersinia* Tyrosine Phosphatase: Specificity of a Bacterial Virulence Determinant for Phosphoproteins in the J774a.1 Macrophage. *The Journal of experimental medicine* 176, 1625-1630.
- BONARDI, S., PARIS, A., BACCI, C., D'INCAU, M., FERRONI, L., BRINDANI, F., 2007. Detection and Characterization of *Yersinia Enterocolitica* from Pigs and Cattle. *Veterinary Research Communications* 31, 347-350.
- BORCH, E., NESBAKKEN, T., CHRISTENSEN, H., 1996. Hazard Identification in Swine Slaughter with Respect to Foodborne Bacteria. *International journal of food microbiology* 30, 9-25.
- BOTTONE, E.J., 1997. *Yersinia Enterocolitica*: The Charisma Continues. *Clinical microbiology reviews* 10, 257-276.
- BOTTONE, E.J., 1999. *Yersinia Enterocolitica*: Overview and Epidemiologic Correlates. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 1, 323-333.
- BRUBAKER, R.R., 1991. Factors Promoting Acute and Chronic Diseases Caused by *Yersiniae*. *Clinical microbiology reviews* 4, 309-324.
- BUCHER, M., MEYER, C., GROTZBACH, B., WACHECK, S., STOLLE, A., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., 2008. Epidemiological Data on Pathogenic *Yersinia Enterocolitica* in Southern Germany During 2000-2006. *Foodborne pathogens and disease* 5, 273-280.
- BUNDESINSTITUT FÜR RISIKOBEWERTUNG, 2008.
http://www.bfr.bund.de/cm/343/Risikoorientierte_Fleischuntersuchung_Soll_Schweinefleisch_Sicherer_Machen.Pdf. 03.02.2013.
- CHARLES RIVER LABORATORIES INTERNATIONAL INC, 2011.
http://www.criver.com/sitecollectiondocuments/Rm_Ld_R_Mfia_Rodent_Methods_Manual.Pdf. 03.07.2013.
- CIOCCHINI, A.E., REY SERANTES, D.A., MELLI, L.J., IWASHKIW, J.A., DEODATO, B., WALLACH, J., FELDMAN, M.F., UGALDE, J.E., COMERCI, D.J., 2013. Development and Validation of a Novel Diagnostic Test for Human Brucellosis Using a Glyco-Engineered Antigen Coupled to Magnetic Beads. *PLoS neglected tropical diseases* 7, e2048.
- CORNELIS, G., 1998. The *Yersinia* Yop Virulon, a Bacterial System to Subvert Cells of the Primary Host Defense. *Folia Microbiologica* 43, 253-261.
- CORNELIS, G.R., BIOT, T., LAMBERT DE ROUVROIT, C., MICHIELS, T., MULDER, B., SLUITERS, C., SORY, M.P., VAN BOUCHAUTE, M., VANOOTEGHEM, J.C., 1989. The *Yersinia* Yop Regulon. *Molecular microbiology* 3, 1455-1459.
- CORNELIS, G.R., VAN GIJSEGEM, F., 2000. Assembly and Function of Type Iii Secretory Systems. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 735-774.
- CROWTHER, J.R., 2001. *The Elisa Guidebook*. Humana Press, Totowa, NJ, XI, 421 S. : Ill., graph. Darst. pp.
- CURTIS, J., BOURNE, F.J., 1971. Immunoglobulin Quantitation in Sow Serum, Colostrum and Milk and the Serum of Young Pigs. *Biochimica et biophysica acta* 236, 319-332.
- DE BOER, E., 1995. Isolation of *Yersinia Enterocolitica* from Foods. *Contributions to microbiology and immunology* 13, 71-73.
- DE BOER, E., NOUWS, J.F.M., 1991. Slaughter Pigs and Pork as a Source of Human Pathogenic *Yersinia Enterocolitica*. *International journal of food microbiology* 12, 375-378.
- DE KONING-WARD, T.F., ROBINS-BROWNE, R.M., 1995. Contribution of Urease to Acid Tolerance in *Yersinia Enterocolitica*. *Infect Immun* 63, 3790-3795.

- DE KONING-WARD, T.F., WARD, A.C., ROBINS-BROWNE, R.M., 1994. Characterisation of the Urease-Encoding Gene Complex of *Yersinia Enterocolitica*. Gene 145, 25-32.
- DELOR, I., KAECKENBEECK, A., WAUTERS, G., CORNELIS, G.R., 1990. Nucleotide Sequence of Yst, the *Yersinia Enterocolitica* Gene Encoding the Heat-Stable Enterotoxin, and Prevalence of the Gene among Pathogenic and Nonpathogenic Yersiniae. Infect Immun 58, 2983-2988.
- DEUTSCHE SAMMLUNG VON MIKROORGANISMEN UND ZELLKULTUREN, 2013. [Http://Old.Dsmz.De/Microorganisms/Bacterial_Nomenclature_Info.Php?Genus=Yersinia&Show_All_Details=1](http://Old.Dsmz.De/Microorganisms/Bacterial_Nomenclature_Info.Php?Genus=Yersinia&Show_All_Details=1). 23.09.2013.
- DOYLE, M.P., HUGDAHL, M.B., TAYLOR, S.L., 1981. Isolation of Virulent *Yersinia Enterocolitica* from Porcine Tongues. Applied and environmental microbiology 42, 661-666.
- DUNBAR, S.A., VANDER ZEE, C.A., OLIVER, K.G., KAREM, K.L., JACOBSON, J.W., 2003. Quantitative, Multiplexed Detection of Bacterial Pathogens: DNA and Protein Applications of the Luminex Labmap System. J Microbiol Methods 53, 245-252.
- EARLEY, M.C., VOGT, R.F., JR., SHAPIRO, H.M., MANDY, F.F., KELLAR, K.L., BELLISARIO, R., PASS, K.A., MARTI, G.E., STEWART, C.C., HANNON, W.H., 2002. Report from a Workshop on Multianalyte Microsphere Assays. Cytometry 50, 239-242.
- EFSA, 2007. Monitoring and Identification of Human Enteropathogenic Species. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. EFSA Journal 595, 1-30.
- EFSA, 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-Borne Outbreaks in 2009. EFSA Journal 2011 9(3).
- ELSHAL, M.F., MCCOY, J.P., 2006. Multiplex Bead Array Assays: Performance Evaluation and Comparison of Sensitivity to Elisa. Methods (San Diego, Calif.) 38, 317-323.
- FLI, 2013. [Http://Www.Fli.Bund.De/De/Startseite/Service/Zulassungsstelle-Des-Fli.Html](http://Www.Fli.Bund.De/De/Startseite/Service/Zulassungsstelle-Des-Fli.Html). 23.08.2013.
- FORSBERG, A., VIITANEN, A.M., SKURNIK, M., WOLF-WATZ, H., 1991. The Surface-Located YopN Protein Is Involved in Calcium Signal Transduction in *Yersinia Pseudotuberculosis*. Molecular microbiology 5, 977-986.
- FREDRIKSEN, W., 1964. A Study of Some *Yersinia Pseudotuberculosis*-Like Bacteria ("*Bacterium Enterocoliticum*" and "*Pasteurella X*"). Scand. Congr. Pathol. Microbiol. 14, 103-104.
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., BUCHER, M., HANK, C., STOLLE, A., KORKEALA, H., 2001a. High Prevalence of *Yersinia Enterocolitica* 4:O3 on Pig Offal in Southern Germany: A Slaughtering Technique Problem. Syst Appl Microbiol 24, 457-463.
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., HIELM, S., KORKEALA, H., 1999. High Prevalence of Yada-Positive *Yersinia Enterocolitica* in Pig Tongues and Minced Meat at the Retail Level in Finland. Journal of food protection 62, 123-127.
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., LINDSTRÖM, M., KORKEALA, H., 2010a. *Yersinia Enterocolitica* and *Yersinia Pseudotuberculosis*, In: Juneja, V.K., Sofos, N.J. (Eds.) Pathogens and Toxins in Foods: Challenge and Interventions. ASM Press, Washington D.C., pp. 164-180.

- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., LYHS, U., KORTE, T., KORKEALA, H., 2001b. Prevalence of Pathogenic *Yersinia Enterocolitica* in Food Samples at Retail Level in Finland. Arch. Lebensmittelhyg. 52, 66-68.
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., MEYER, C., BONKE, R., STUBER, E., WACHECK, S., 2010b. Characterization of *Yersinia Enterocolitica* 4/O:3 Isolates from Tonsils of Bavarian Slaughter Pigs. Letters in applied microbiology 50, 412-418.
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., STOLLE, A., STEPHAN, R., 2007. Prevalence of Pathogenic *Yersinia Enterocolitica* in Pigs Slaughtered at a Swiss Abattoir. International journal of food microbiology 119, 207-212.
- FREDRIKSSON-AHOMAA, M., WACHECK, S., 2011. Enteropathogene Yersinien: Pathogenität, Erkrankung, Diagnostik Und Präventionsmaßnahmen, Vol 1. Behr's Verlag, Hamburg, 92 p.
- FUKUSHIMA, H., 1987. New Selective Agar Medium for Isolation of Virulent *Yersinia Enterocolitica*. Journal of clinical microbiology 25, 1068-1073.
- FUKUSHIMA, H., GOMYODA, M., 1986. Growth of *Yersinia Pseudotuberculosis* and *Yersinia Enterocolitica* Biotype 3b Serotype O3 Inhibited on Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin Agar. Journal of clinical microbiology 24, 116-120.
- FUKUSHIMA, H., GOMYODA, M., 1991. Intestinal Carriage of *Yersinia Pseudotuberculosis* by Wild Birds and Mammals in Japan. Applied and environmental microbiology 57, 1152-1155.
- FUKUSHIMA, H., HOSHINA, K., ITOGAWA, H., GOMYODA, M., 1997. Introduction into Japan of Pathogenic *Yersinia* through Imported Pork, Beef and Fowl. International journal of food microbiology 35, 205-212.
- FULTON, R.J., MCDADE, R.L., SMITH, P.L., KIENKER, L.J., KETTMAN, J.R., JR., 1997. Advanced Multiplexed Analysis with the Flowmetrix System. Clinical chemistry 43, 1749-1756.
- GALYOV, E.E., HAKANSSON, S., WOLF-WATZ, H., 1994. Characterization of the Operon Encoding the Ypka Ser/Thr Protein Kinase and the Yopj Protein of *Yersinia Pseudotuberculosis*. Journal of bacteriology 176, 4543-4548.
- GAYRAUD, M., SCAVIZZI, M.R., MOLLARET, H.H., GUILLEVIN, L., HORNSTEIN, M.J., 1993. Antibiotic Treatment of *Yersinia Enterocolitica* Septicemia: A Retrospective Review of 43 Cases. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 17, 405-410.
- GEMSKI, P., LAZERE, J.R., CASEY, T., 1980. Plasmid Associated with Pathogenicity and Calcium Dependency of *Yersinia Enterocolitica*. Infect Immun 27, 682-685.
- GRANFORS, K., VILJANEN, M., TIILIKAINEN, A., TOIVANEN, A., 1980. Persistence of IgM, IgG, and IgA Antibodies to *Yersinia* in Yersinia Arthritis. J Infect Dis 141, 424-429.
- GUDULA, S., 2011. *Yersinia Enterocolitica* Outer Protein T (Yopt). European Journal of Cell Biology 90, 955-958.
- HAHN, H., KAUFMANN, S.H.E., SUERBAUM, S., SCHULZ, T.F., 2009. Medizinische Mikrobiologie Und Infektiologie, 6., komplett überarb. Aufl. Edition. Springer, Heidelberg, XXIV, 890 S. pp.
- HAN, T.H., PAIK, I.K., KIM, S.J., 2003. Molecular Relatedness between Isolates *Yersinia Pseudotuberculosis* from a Patient and an Isolate from Mountain Spring Water. Journal of Korean medical science 18, 425-428.
- HANSKI, C., KUTSCHKA, U., SCHMORANZER, H.P., NAUMANN, M., STALLMACH, A., HAHN, H., MENGE, H., RIECKEN, E.O., 1989. Immunohistochemical and Electron Microscopic Study of Interaction of

- Yersinia Enterocolitica* Serotype O8 with Intestinal Mucosa During Experimental Enteritis. *Infect Immun* 57, 673-678.
- HARRISON, W.A., PETERS, A.C., FIELDING, L.M., 2000. Growth of *Listeria Monocytogenes* and *Yersinia Enterocolitica* Colonies under Modified Atmospheres at 4 and 8 Degrees C Using a Model Food System. *Journal of applied microbiology* 88, 38-43.
- HEESEMANN, J., 1990. Enteropathogene Yersinien: Pathogenitätsfaktoren Und Neue Diagnostische Methoden. *Immunität und Infektion* 18, 186-191.
- HEIM, F., FEHLHABER, K., SCHEIBNER, G., 1984. The Behavior of *Yersinia Enterocolitica* at Different Temperatures and at Various Concentrations of Curing Salt. *Archiv für experimentelle Veterinärmedizin* 38, 729-734.
- HENSEL, A., NIKOLAOU, K., BARTLING, C., PETRY, T., ARNOLD, T., ROSLER, U., CZERNY, C.P., TRUYEN, U., NEUBAUER, H., 2004. The Prevalence of Anti-*Yersinia* Outer Protein Antibodies in Bavarian Slaughter Pigs. *Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift* 117, 30-38.
- HIGHSMITH, A.K., FEELEY, J.C., SKALIY, P., WELLS, J.G., WOOD, B.T., 1977. Isolation of *Yersinia Enterocolitica* from Well Water and Growth in Distilled Water. *Applied and environmental microbiology* 34, 745-750.
- HOLT, J.G., 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9. ed. Edition. Williams & Wilkins, Baltimore u.a., 787 p.
- HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A., DE KONING, J., 1990. Clinical Aspects, Diagnosis and Therapy of *Yersinia Enterocolitica* Infections. *Immunität und Infektion* 18, 192-197.
- HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A., DE KONING, J., HEESEMANN, J., FESTEN, J.J., HOUTMAN, P.M., VAN OYEN, P.L., 1992. Influence of Antibiotics on IgA and IgG Response and Persistence of *Yersinia Enterocolitica* in Patients with *Yersinia*-Associated Spondylarthropathy. *Infection* 20, 53-57.
- HOOGKAMP-KORSTANJE, J.A.A., DE KONING, J., HEESEMANN, J., 1988. Persistence of *Yersinia Enterocolitica* in Man. *Infection* 16, 81-85.
- IFSG, 2000. Gesetz zur Verhütung und Bekämpfung von Infektionskrankheiten beim Menschen - Infektionsschutzgesetz.
- IRIARTE, M., VANOOTEGHEM, J.C., DELOR, I., DIAZ, R., KNUTTON, S., CORNELIS, G.R., 1993. The Myf Fibrillae of *Yersinia Enterocolitica*. *Molecular microbiology* 9, 507-520.
- ISBERG, R.R., LEONG, J.M., 1990. Multiple Beta 1 Chain Integrins Are Receptors for Invasin, a Protein That Promotes Bacterial Penetration into Mammalian Cells. *Cell* 60, 861-871.
- JACOBSEN, N.R., BOGDANOVICH, T., SKURNIK, M., LUBECK, P.S., AHRENS, P., HOORFAR, J., 2005. A Real-Time Pcr Assay for the Specific Identification of Serotype O:9 of *Yersinia Enterocolitica*. *J Microbiol Methods* 63, 151-156.
- JALAVA, K., HAKKINEN, M., VALKONEN, M., NAKARI, U.M., PALO, T., HALLANVUO, S., OLLGREN, J., SIITONEN, A., NUORTI, J.P., 2006. An Outbreak of Gastrointestinal Illness and Erythema Nodosum from Grated Carrots Contaminated with *Yersinia Pseudotuberculosis*. *J Infect Dis* 194, 1209-1216.
- KARAPINAR, M., GONUL, S.A., 1992. Effects of Sodium Bicarbonate, Vinegar, Acetic and Citric Acids on Growth and Survival of *Yersinia Enterocolitica*. *International journal of food microbiology* 16, 343-347.
- KEIJ, J.F., STEINKAMP, J.A., 1998. Flow Cytometric Characterization and Classification of Multiple Dual-Color Fluorescent Microspheres Using Fluorescence Lifetime. *Cytometry* 33, 318-323.

- KELLAR, K.L., IANNONE, M.A., 2002. Multiplexed Microsphere-Based Flow Cytometric Assays. *Experimental hematology* 30, 1227-1237.
- KETTMAN, J.R., DAVIES, T., CHANDLER, D., OLIVER, K.G., FULTON, R.J., 1998. Classification and Properties of 64 Multiplexed Microsphere Sets. *Cytometry* 33, 234-243.
- KORTE, T., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., NISKANEN, T., KORKEALA, H., 2004. Low Prevalence of Yada-Positive *Yersinia Enterocolitica* in Sows. *Foodborne pathogens and disease* 1, 45-52.
- LAITENEN, O., TUUHEA, J., AHVONEN, P., 1972. Polyarthritis Associated with *Yersinia Enterocolitica* Infection. Clinical Features and Laboratory Findings in Nine Cases with Severe Joint Symptoms. *Annals of the rheumatic diseases* 31, 34-39.
- LAUKKANEN, R., MARTINEZ, P.O., SIEKKINEN, K.M., RANTA, J., MAIJALA, R., KORKEALA, H., 2008. Transmission of *Yersinia Pseudotuberculosis* in the Pork Production Chain from Farm to Slaughterhouse. *Applied and environmental microbiology* 74, 5444-5450.
- LAUKKANEN, R., MARTINEZ, P.O., SIEKKINEN, K.M., RANTA, J., MAIJALA, R., KORKEALA, H., 2009. Contamination of Carcasses with Human Pathogenic *Yersinia Enterocolitica* 4/O:3 Originates from Pigs Infected on Farms. *Foodborne pathogens and disease* 6, 681-688.
- LEUNG, K.Y., REISNER, B.S., STRALEY, S.C., 1990. Yopm Inhibits Platelet Aggregation and Is Necessary for Virulence of *Yersinia Pestis* in Mice. *Infect Immun* 58, 3262-3271.
- LIAN, C.J., HWANG, W.S., KELLY, J.K., PAI, C.H., 1987. Invasiveness of *Yersinia Enterocolitica* Lacking the Virulence Plasmid: An in-Vivo Study. *Journal of medical microbiology* 24, 219-226.
- LISI, P.J., HUANG, C.W., HOFFMAN, R.A., TEIPEL, J.W., 1982. A Fluorescence Immunoassay for Soluble Antigens Employing Flow Cytometric Detection. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 120, 171-179.
- MÄKI-IKOLA, O., HEESEMANN, J., TOIVANEN, A., GRANFORS, K., 1997. High Frequency of *Yersinia* Antibodies in Healthy Populations in Finland and Germany. *Rheumatology International* 16, 227-229.
- MARTINEZ, P.O., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., PALLOTTI, A., ROSMINI, R., HOUF, K., KORKEALA, H., 2011. Variation in the Prevalence of Enteropathogenic *Yersinia* in Slaughter Pigs from Belgium, Italy, and Spain. *Foodborne pathogens and disease* 8, 445-450.
- MARTINEZ, P.O., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., SOKOLOVA, Y., ROASTO, M., BERZINS, A., KORKEALA, H., 2009. Prevalence of Enteropathogenic *Yersinia* in Estonian, Latvian, and Russian (Leningrad Region) Pigs. *Foodborne pathogens and disease* 6, 719-724.
- MCHUGH, T.M., VIELE, M.K., CHASE, E.S., RECKTENWALD, D.J., 1997. The Sensitive Detection and Quantitation of Antibody to Hcv by Using a Microsphere-Based Immunoassay and Flow Cytometry. *Cytometry* 29, 106-112.
- MCIVER, P., 1934. Chronic Glanders-Like Infection of Face Caused by an Organism Resembling *Flavobacterium Pseudomallei* Whitmore. In: Mary Imogene Bassett Hospital, Editor. *Clinical Miscellany*. 1: Springfield, Il: Charles C. Thomas. unbekannt unbekannt, 16-21.
- MILLER, V.L., FALKOW, S., 1988. Evidence for Two Genetic Loci in *Yersinia Enterocolitica* That Can Promote Invasion of Epithelial Cells. *Infect Immun* 56, 1242-1248.

- MILLER, V.L., FARMER, J.J., 3RD, HILL, W.E., FALKOW, S., 1989. The Ail Locus Is Found Uniquely in *Yersinia Enterocolitica* Serotypes Commonly Associated with Disease. *Infect Immun* 57, 121-131.
- MIURA, K., ORCUTT, A.C., MURATOVA, O.V., MILLER, L.H., SAUL, A., LONG, C.A., 2008. Development and Characterization of a Standardized Elisa Including a Reference Serum on Each Plate to Detect Antibodies Induced by Experimental Malaria Vaccines. *Vaccine* 26, 193-200.
- MORGAN, E., VARRO, R., SEPULVEDA, H., EMBER, J.A., APGAR, J., WILSON, J., LOWE, L., CHEN, R., SHIVRAJ, L., AGADIR, A., CAMPOS, R., ERNST, D., GAUR, A., 2004. Cytometric Bead Array: A Multiplexed Assay Platform with Applications in Various Areas of Biology. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 110, 252-266.
- NAJDENSKI, H., ITEMAN, I., CARNIEL, E., 1994. Efficient Subtyping of Pathogenic *Yersinia Enterocolitica* Strains by Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Journal of clinical microbiology* 32, 2913-2920.
- NAKAJIMA, H., INOUE, M., MORI, T., ITOH, K., ARAKAWA, E., WATANABE, H., 1992. Detection and Identification of *Yersinia Pseudotuberculosis* and Pathogenic *Yersinia Enterocolitica* by an Improved Polymerase Chain Reaction Method. *Journal of clinical microbiology* 30, 2484-2486.
- NESBAKKEN, T., ECKNER, K., HOIDAL, H.K., ROTTERUD, O.J., 2003. Occurrence of *Yersinia Enterocolitica* and *Campylobacter* Spp. In Slaughter Pigs and Consequences for Meat Inspection, Slaughtering, and Dressing Procedures. *International journal of food microbiology* 80, 231-240.
- NESBAKKEN, T., ECKNER, K., ROTTERUD, O.J., 2008. The Effect of Blast Chilling on Occurrence of Human Pathogenic *Yersinia Enterocolitica* Compared to *Campylobacter* Spp. And Numbers of Hygienic Indicators on Pig Carcasses. *International journal of food microbiology* 123, 130-133.
- NESBAKKEN, T., IVERSEN, T., ECKNER, K., LIUM, B., 2006. Testing of Pathogenic *Yersinia Enterocolitica* in Pig Herds Based on the Natural Dynamic of Infection. *International journal of food microbiology* 111, 99-104.
- NESBAKKEN, T., NERBRINK, E., ROTTERUD, O.J., BORCH, E., 1994. Reduction of *Yersinia Enterocolitica* and *Listeria* Spp. On Pig Carcasses by Enclosure of the Rectum During Slaughter. *International journal of food microbiology* 23, 197-208.
- NEUBAUER, H., SPRAGUE, L.D., SCHOLZ, H., HENSEL, A., 2001. *Yersinia Enterocolitica* Infections: 1. Impact on Animal Health. *Berliner und Munchener tierärztliche Wochenschrift* 114, 8-12.
- NIELSEN, S.S., HOUE, H., ERSBOLL, A.K., TOFT, N., 2004. Evaluating Diagnostic Tests, In: Houe H., E.A.K., Toft N., (Ed.) *Introduction to Veterinary Epidemiology*. biofolia, Frederiksberg, Dänemark, 133-151.
- NISKANEN, T., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., KORKEALA, H., 2002. *Yersinia Pseudotuberculosis* with Limited Genetic Diversity Is a Common Finding in Tonsils of Fattening Pigs. *Journal of food protection* 65, 540-545.
- NOWAK, B., MUEFFLING, T.V., CASPARI, K., HARTUNG, J., 2006. Validation of a Method for the Detection of Virulent *Yersinia Enterocolitica* and Their Distribution in Slaughter Pigs from Conventional and Alternative Housing Systems. *Vet Microbiol* 117, 219-228.
- NOWGESIC, E., FYFE, M., HOCKIN, J., KING, A., NG, H., PACCAGNELLA, A., TRINIDAD, A., WILCOTT, L., SMITH, R., DENNEY, A., STRUCK, L., EMBREE, G., HIGO, K., CHAN, J.I., MARKEY, P., MARTIN, S., BUSH, D., 1999. Outbreak of *Yersinia Pseudotuberculosis* in British Columbia--November

1998. Canada communicable disease report = Relevé des maladies transmissibles au Canada 25, 97-100.
- NUORTI, J.P., NISKANEN, T., HALLANVUO, S., MIKKOLA, J., KELA, E., HATAKKA, M., FREDRIKSSON-AHOMAA, M., LYYTIKAINEN, O., SIITONEN, A., KORKEALA, H., RUUTU, P., 2004. A Widespread Outbreak of *Yersinia Pseudotuberculosis* O:3 Infection from Iceberg Lettuce. *J Infect Dis* 189, 766-774.
- O'BEIRNE, A.J., COOPER, H.R., 1979. Heterogeneous Enzyme Immunoassay. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* 27, 1148-1162.
- PAERREGAARD, A., 1992. Interactions between *Yersinia Enterocolitica* and the Host with Special Reference to Virulence Plasmid Encoded Adhesion and Humoral Immunity. *Danish medical bulletin* 39, 155-172.
- PAERREGAARD, A., ESPERSEN, F., JENSEN, O.M., SKURNIK, M., 1991. Interactions between *Yersinia Enterocolitica* and Rabbit Ileal Mucus: Growth, Adhesion, Penetration, and Subsequent Changes in Surface Hydrophobicity and Ability to Adhere to Ileal Brush Border Membrane Vesicles. *Infect Immun* 59, 253-260.
- PALONEN, E., LINDSTROM, M., KORKEALA, H., 2010. Adaptation of Enteropathogenic *Yersinia* to Low Growth Temperature. *Critical reviews in microbiology* 36, 54-67.
- PEPE, J.C., MILLER, V.L., 1993. *Yersinia Enterocolitica* Invasin: A Primary Role in the Initiation of Infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, 6473-6477.
- PEPE, J.C., WACHTEL, M.R., WAGAR, E., MILLER, V.L., 1995. Pathogenesis of Defined Invasion Mutants of *Yersinia Enterocolitica* in a Balb/C Mouse Model of Infection. *Infect Immun* 63, 4837-4848.
- PIN, C., BARANYI, J., DE FERNANDO, G.G., 2000. Predictive Model for the Growth of *Yersinia Enterocolitica* under Modified Atmospheres. *Journal of applied microbiology* 88, 521-530.
- PORTNOY, D.A., FALKOW, S., 1981. Virulence-Associated Plasmids from *Yersinia Enterocolitica* and *Yersinia Pestis*. *Journal of bacteriology* 148, 877-883.
- PORTNOY, D.A., MOSELEY, S.L., FALKOW, S., 1981. Characterization of Plasmids and Plasmid-Associated Determinants of *Yersinia Enterocolitica* Pathogenesis. *Infect Immun* 31, 775-782.
- PROGEN BIOTECHNIK, 2012. http://Www.Multimetrix.Com/Fileadmin/Pdf/Technologie_De.Pdf. 05.04.2012.
- RASTAWICKI, W., SZYCH, J., GIERCZYNSKI, R., ROKOSZ, N., 2009. A Dramatic Increase of *Yersinia Enterocolitica* Serogroup O:8 Infections in Poland. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 28, 535-537.
- REISNER, B.S., STRALEY, S.C., 1992. *Yersinia Pestis* Yopm: Thrombin Binding and Overexpression. *Infect Immun* 60, 5242-5252.
- RKI 2012. Infektionsepidemiologisches Jahrbuch Meldepflichtiger Krankheiten Für 2011.
- RKI, 2013. <http://Www3.Rki.De/Survstat/Queryform.AspX>. 09.08.2013.
- ROBINS-BROWNE, R.M., 1997. *Yersinia Enterocolitica*, In: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.) *Food Microbiology, Fundamentals and Frontiers*. ASM Press, Washington D.C., pp. 192-215.

- ROSNER, B.M., STARK, K., HOHLE, M., WERBER, D., 2011. Risk Factors for Sporadic *Yersinia Enterocolitica* Infections, Germany 2009-2010. *Epidemiology and infection*, 1-10.
- ROSNER, B.M., STARK, K., WERBER, D., 2010. Epidemiology of Reported *Yersinia Enterocolitica* Infections in Germany, 2001-2008. *BMC public health* 10, 337.
- ROSQVIST, R., FORSBERG, A., RIMPIAINEN, M., BERGMAN, T., WOLF-WATZ, H., 1990. The Cytotoxic Protein Yope of *Yersinia* Obstructs the Primary Host Defence. *Molecular microbiology* 4, 657-667.
- ROSQVIST, R., FORSBERG, A., WOLF-WATZ, H., 1991. Intracellular Targeting of the *Yersinia* Yope Cytotoxin in Mammalian Cells Induces Actin Microfilament Disruption. *Infect Immun* 59, 4562-4569.
- SCHIEHMANN, D., 1989. *Yersinia Enterocolitica* and *Yersinia Pseudotuberculosis*, In: Doyle, M.P. (Ed.) *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp. 601-672.
- SCHIEHMANN, D.A., 1979. Synthesis of a Selective Agar Medium for *Yersinia Enterocolitica*. *Canadian journal of microbiology* 25, 1298-1304.
- SMEGO, R.A., FREAN, J., KOORNHOF, H.J., 1999. Yersiniosis I: Microbiological and Clinicoepidemiological Aspects of Plague and Non-Plague *Yersinia* Infections. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 18, 1-15.
- SMULDERS, F.J., BUNCIC, S., FEHLHABER, K., HUEY, R.J., KORKEALA, H., PRIETO, M., STEINHAUSEROVA, I., 2012. Toward Harmonization of the European Food Hygiene/Veterinary Public Health Curriculum. *Journal of veterinary medical education* 39, 169-179.
- STENGEL, G., 1986. Diagnosis and Occurrence of *Yersinia Enterocolitica* in Water. *Zentralblatt für Veterinärmedizin. Reihe B. Journal of veterinary medicine. Series B* 33, 82-92.
- STRALEY, S.C., PERRY, R.D., 1995. Environmental Modulation of Gene Expression and Pathogenesis in *Yersinia*. *Trends Microbiol* 3, 310-317.
- STRALEY, S.C., SKRZYPEK, E., PLANO, G.V., BLISKA, J.B., 1993. Yops of *Yersinia* Spp. Pathogenic for Humans. *Infect Immun* 61, 3105-3110.
- SYRJALA, M.T., TOLO, H., KOISTINEN, J., KRUSIUS, T., 1991. Determination of Anti-Iga Antibodies with a Flow Cytometer-Based Microbead Immunoassay (Mia). *Journal of immunological methods* 139, 265-270.
- TAUXE, R.V., VANDEPITTE, J., WAUTERS, G., MARTIN, S.M., GOOSSENS, V., DE MOL, P., VAN NOYEN, R., THIERS, G., 1987. *Yersinia Enterocolitica* Infections and Pork: The Missing Link. *Lancet* 1, 1129-1132.
- THOERNER, P., BIN KINGOMBE, C.I., BOGLI-STUBER, K., BISSIG-CHOISAT, B., WASSENAAR, T.M., FREY, J., JEMMI, T., 2003. Pcr Detection of Virulence Genes in *Yersinia Enterocolitica* and *Yersinia Pseudotuberculosis* and Investigation of Virulence Gene Distribution. *Applied and environmental microbiology* 69, 1810-1816.
- TIZARD, I.R., 2004. *Veterinary Immunology: An Introduction*. Saunders, Philadelphia, PA.
- TOMASO, H., MOOSEDER, G., AL DAHOUK, S., BARTLING, C., SCHOLZ, H.C., STRAUSS, R., TREU, T.M., NEUBAUER, H., 2006. Seroprevalence of Anti-*Yersinia* Antibodies in Healthy Austrians. *European journal of epidemiology* 21, 77-81.
- TOORA, S., BUDU-AMOAKO, E., ABLETT, R.F., SMITH, J., 1992. Effect of High-Temperature Shorttime Pasteurisation, Freezing and Thawing and Constant

- Freezing, on Survival of *Yersinia Enterocolitica* in Milk. J. Food Prot. 55, 803-805.
- TSUBOKURA, M., ALEKSIC, S., 1995. A Simplified Antigenic Scheme for Serotyping of *Yersinia Pseudotuberculosis*: Phenotypic Characterization of Reference Strains and Preparation of O and H Factor Sera. Contributions to microbiology and immunology 13, 99-105.
- VAN DER HEIJDEN, I.M., RES, P.C., WILBRINK, B., LEOW, A., BREEDVELD, F.C., HEESEMANN, J., TAK, P.P., 1997. *Yersinia Enterocolitica*: A Cause of Chronic Polyarthritis. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 25, 831-837.
- VAN EMON, J.M., 2007. Immunoassay and Other Bioanalytical Techniques. CRC Press/Taylor & Francis.
- VIGNALI, D.A., 2000. Multiplexed Particle-Based Flow Cytometric Assays. Journal of immunological methods 243, 243-255.
- VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D.E., 1978. Enzyme Immunoassays with Special Reference to Elisa Techniques. Journal of clinical pathology 31, 507-520.
- WANNET, W.J., REESSINK, M., BRUNINGS, H.A., MAAS, H.M., 2001. Detection of Pathogenic *Yersinia Enterocolitica* by a Rapid and Sensitive Duplex Pcr Assay. Journal of clinical microbiology 39, 4483-4486.
- WAUTERS, G., KANDOLO, K., JANSSENS, M., 1987. Revised Biogrouping Scheme of *Yersinia Enterocolitica*. Contributions to microbiology and immunology 9, 14-21.
- WHO, 2012. <http://Www.Who.Int/Zoonoses/En/Index.Html>. 02.11.2012.
- YANG, Y., MERRIAM, J.J., MUELLER, J.P., ISBERG, R.R., 1996. The Psa Locus Is Responsible for Thermoinducible Binding of *Yersinia Pseudotuberculosis* to Cultured Cells. Infect Immun 64, 2483-2489.
- ZHENG, X.B., 1987. Isolation of *Yersinia Enterocolitica* from the Faeces of Diarrhoeic Swine. The Journal of applied bacteriology 62, 521-525.

IX ABBILDUNGSVERZEICHNIS

- Abbildung 1: Grundprinzip eines direkten ELISA (eigene Darstellung)
- Abbildung 2: Grundprinzip eines indirekten ELISA (eigene Darstellung)
- Abbildung 3: Klassifizierung der Mikrosphären in jeweils zehn verschiedene Konzentrationsstufen zweier unterschiedlicher Fluoreszenzfarbstoffe (PROGEN BIOTECHNIK, 2012)
- Abbildung 4: Ablauf der Nachweisreaktion mittels Beadassay (PROGEN BIOTECHNIK, 2012)
- Abbildung 5: Exemplarische Klassifizierung je nach Beadregion bzw. Analyt sowie Quantifizierung der Analyten nach Fluoreszenzsignal in Mittlerer Fluoreszenzintensität (MFI) (PROGEN BIOTECHNIK, 2012)
- Abbildung 6: Schematische Darstellung der zwei nacheinander ablaufenden biochemischen Vorgänge während des Aktivierungsprozesses (Mikrogen, 2012, firmeninternes Manuskript)
- Abbildung 7: Biochemischer Vorgang der kovalenten Kopplung der Antigene an die Mikrosphären (Mikrogen, 2012, firmeninternes Manuskript)
- Abbildung 8: Biochemischer Prozess der Blockierung der beschichteten Mikrosphären mittels Tris-Molekülen (Mikrogen, 2012, firmeninternes Manuskript)
- Abbildung 9: MFI-Werte von YopD in Abhängigkeit von eingesetztem Biotin (Dianova) bei konstanter Konzentration an Streptavidin-PE (Invitrogen)
- Abbildung 10: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von YopD in Abhängigkeit von eingesetztem Streptavidin-PE (Invitrogen) bei konstanter Konzentration an Biotin (Dianova)
- Abbildung 11: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der FK in Abhängigkeit der Streptavidin-PE-Konzentration (Invitrogen)
- Abbildung 12: Abhängigkeit der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der FK von der Streptavidin-PE-Konzentration (Invitrogen) ohne Zugabe von Serum oder Biotin
- Abbildung 13: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der FK in Abhängigkeit der Streptavidin-PE-Konzentration zweier unterschiedlicher Hersteller (Prozyme und Moss)

- Abbildung 14: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von YopD in Abhängigkeit der Streptavidin-PE-Konzentration (Hersteller Prozyme) bei konstanter Biotin-Konzentration im Test mit vier unterschiedlichen porcinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)
- Abbildung 15: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der FK in Abhängigkeit der Streptavidin-PE-Konzentration (Hersteller Prozyme) im Test mit vier unterschiedlichen porcinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)
- Abbildung 16: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von YopD in Abhängigkeit der Streptavidin-PE-Konzentration (Moss) bei konstanter Biotin-Konzentration im Test mit vier unterschiedlichen porcinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)
- Abbildung 17: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der FK in Abhängigkeit von der Streptavidin-PE-Konzentration (Moss) im Test mit vier unterschiedlichen porcinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)
- Abbildung 18: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) von YopD bei steigenden Konzentrationen von Anti-Schwein-IgG konjugiert an R-Phycoerythrin im Test mit vier unterschiedlichen porcinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)
- Abbildung 19: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der FK bei steigenden Konzentrationen von Anti-Schwein-IgG konjugiert an R-Phycoerythrin im Test mit vier unterschiedlichen porcinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)
- Abbildung 20: Vergleich der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der FK der vier unterschiedlichen porcinen Seren sowie des gnotobiotischen Ferkels (F) bei 60 min Vorinkubation im Vergleich zu 30 min Vorinkubation
- Abbildung 21: Vergleich der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der FK der vier unterschiedlichen porcinen Seren sowie des gnotobiotischen Ferkels (F) bei 60 min Vorinkubation zu 30 min Vorinkubation
- Abbildung 22: Vergleich der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) von YopD bei 30 Minuten Vorinkubation von Biotin und Streptavidin-PE im Vergleich zu Anti-Schwein-IgG-Konjugat konjugiert an R-Phycoerythrin im Test mit

vier unterschiedlichen porzinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)

Abbildung 23: Vergleich der Mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der FK bei 30 Minuten Vorinkubation von Biotin und Streptavidin-PE im Vergleich zu Anti-Schwein-IgG konjugiert an R-Phycoerythrin im Test mit vier unterschiedlichen porzinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)

Abbildung 24: Mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) der IK in Abhängigkeit der gekoppelten Beschichtungskonzentration im Test mit vier unterschiedlichen porzinen Seren und dem Serum des gnotobiotischen Ferkels (F)

X TABELLENVERZEICHNIS

- Tabelle 1: Einteilung der pathogenen Serovare nach Biovar
- Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Seren und Muskelproben
- Tabelle 3: Biologische Eigenschaften und Zusammensetzung des Lagerungspuffers der verwendeten *Yersinia* spp. Antigene
- Tabelle 4: Zusammensetzung und Hersteller der verwendeten Antikörper
- Tabelle 5: Zusammensetzung, Bezugsquelle und Artikelnummer der verwendeten Detektormoleküle
- Tabelle 6: Zusammensetzung der hergestellten und verwendeten Puffer in alphabetischer Reihenfolge
- Tabelle 7: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen
- Tabelle 8: Beschichtungsinformationen der verwendeten Antigene
- Tabelle 9: Template zur Messung eines Testmixes nach vollständiger Kopplung aller Beadregionen
- Tabelle 10: Klassifizierung der Seren in Yersinia-positiv, fraglich und negativ
- Tabelle 11: Kriterien zur Speziesdifferenzierung
- Tabelle 12: Ergebnisse des Testmixes für YopH bei einer Beschichtungskonzentration von 30 ng/µl
- Tabelle 13: Ergebnisse des Testmixes für YopH bei einer Beschichtungskonzentration von 10 ng/µl
- Tabelle 14: Ergebnisse des Testmixes für YopN bei einer Beschichtungskonzentration von 30 ng/µl
- Tabelle 15: Ergebnisse des Testmixes für YopN bei einer Beschichtungskonzentration von 10 ng/µl
- Tabelle 16: Ergebnisse der einzelnen Antigene der Seren inklusive ihres Cut-Off und ihrer Differenzierung
- Tabelle 17: Reproduzierbarkeit von YopM mit Serum
- Tabelle 18: Reproduzierbarkeit von VAG-A mit Serum
- Tabelle 19: Reproduzierbarkeit von PsaA mit Serum
- Tabelle 20: Reproduzierbarkeit von YopD mit Serum
- Tabelle 21: Reproduzierbarkeit von MyfA mit Serum
- Tabelle 22: Reproduzierbarkeit von YopE mit Serum
- Tabelle 23: Reproduzierbarkeit von YopH mit Serum

Tabelle 24: Reproduzierbarkeit von YopN mit Serum

Tabelle 25: Gefundene Beads pro Region beispielhaft anhand eines zufällig ausgewählten Fleischtropfsaftes in den verschiedenen Verdünnungsstufen

Tabelle 26: Gefundene Beads pro Beadregion im Test mit einer beispielhaft gewählten Fleischtropfsaftprobe in den verschiedenen Verdünnungsstufen nach Zentrifugation, Filtration bzw. nach Zentrifugation und Filtration

Tabelle 27: Ergebnisse der einzelnen Antigene für Fleischtropfsaft inklusive ihres Cut-Off und ihrer Differenzierung

Tabelle 28: Reproduzierbarkeit von YopM mit Fleischtropfsaft

Tabelle 29: Reproduzierbarkeit von VAG-A mit Fleischtropfsaft

Tabelle 30: Reproduzierbarkeit von PsaA mit Fleischtropfsaft

Tabelle 31: Reproduzierbarkeit von YopD mit Fleischtropfsaft

Tabelle 32: Reproduzierbarkeit von MyfA mit Fleischtropfsaft

Tabelle 33: Reproduzierbarkeit von YopE mit Fleischtropfsaft

Tabelle 34: Reproduzierbarkeit von YopH mit Fleischtropfsaft

Tabelle 35: Reproduzierbarkeit von YopN mit Fleischtropfsaft

Tabelle 36: Sensitivität und Spezifität des *recom*Bead Yersinia pig im Vergleich zum PIGTYPE® YOPSCREEN als Referenzmethode im Test mit Serum

Tabelle 37: Sensitivität und Spezifität des *recom*Bead Yersinia pig im Vergleich zum PIGTYPE® YOPSCREEN als Referenzmethode im Test mit Fleischtropfsaft

XI DANKSAGUNG

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. habil. Manfred Gareis für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung.

Die experimentellen Arbeiten wurden bei der Firma Mikrogen, Neuried, Deutschland, unter Mentorschaft von Herrn Dipl.-Biologen Geren Göttner durchgeführt. Auch hierfür mein herzlicher Dank an ihn und die Firma Mikrogen.

Mein ganz besonderer Dank gebührt Frau Dr. Silke Wacheck für die intensive Betreuung während der zwei Jahre. Ich hätte mir keine bessere Betreuung vorstellen können. Vielen Dank für die ganze Unterstützung, die geduldige Beantwortung meiner Fragen und die Hilfe während der möglichen und unmöglichen Zeiten bei Probenahmen am Schlachthof.

Außerdem möchte ich mich noch bei Sieglinde Schinzel und Angelika Wunder bedanken, die mir im Labor halfen, wo sie nur konnten und mich auch bei Rückschlägen immer bei Laune gehalten haben.

Trotz mancher Skepsis erklärten sich doch einige bayerische amtliche Tierärzte und Schlachthofleiter bereit, uns Proben nehmen zu lassen. Tausend Dank hierfür. Ohne sie hätte die Arbeit nicht stattfinden können.

Hätte sich nicht die Tierklinik Haar auf einen Erstversuch in Sachen Anfangsassistentin in Teilzeit eingelassen, wäre jetzt sicherlich einiges anders. Danke an dieser Stelle für geregelte, wenn auch anstrengende, Arbeitszeiten und die Möglichkeit, den Wunsch nach einer Dissertation mit klinischer Arbeit verbinden zu können. Vielen Dank für die lehrreiche Zeit mit Euch.

Entschuldigung an dieser Stelle an meine Familie und meinen Freund für die vielen Stunden des Jammerns und des Zweifelns. Und danke für jedes aufmunternde Wort. Es hat geholfen.

ANHANG

1 AUSWERTUNG SERUM IM BEADASSAY/ELISA

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1							
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19	ELISA						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH1.1	0,06	0,26	0,10	0,72	0,19	0,36	0,31	0,12	0	negativ	0		0,003	negativ	gleich
SH1.2	0,17	0,27	0,14	0,23	0,28	0,56	0,39	0,31	0	negativ	0		0,010	negativ	gleich
SH1.3	0,10	0,25	0,09	0,33	0,17	0,41	0,25	0,15	0	negativ	0		-0,004	negativ	gleich
SH1.4	0,04	0,10	0,09	0,18	0,18	0,43	0,18	0,11	0	negativ	0		-0,021	negativ	gleich
SH1.5	0,03	0,26	0,48	0,17	0,29	0,77	0,67	0,22	0	negativ	0		-0,004	negativ	gleich
SH1.6	0,08	0,27	0,07	0,20	0,13	0,34	0,45	0,18	0	negativ	0		-0,023	negativ	gleich
SH1.7	0,05	0,11	0,17	0,11	0,14	0,41	0,26	0,11	0	negativ	0		-0,015	negativ	gleich
SH1.8	0,03	0,30	0,06	0,14	0,11	0,31	0,18	0,16	0	negativ	0		0,025	negativ	gleich
SH1.10	0,04	0,31	0,08	0,36	0,14	0,28	0,28	0,10	0	negativ	0		0,011	negativ	gleich
SH1.11	0,05	0,26	0,05	0,40	0,12	0,38	0,29	0,11	0	negativ	0		0,001	negativ	gleich
SH1.12	0,02	0,20	0,07	0,49	0,17	0,22	0,33	0,16	0	negativ	0		-0,011	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1							
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19	ELISA						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH1.13	0,26	0,42	0,10	0,42	0,29	0,96	0,29	0,69	0	negativ	0		-0,015	negativ	gleich
SH1.14	0,03	0,20	0,09	0,18	0,14	0,25	0,35	0,26	0	negativ	0		0,056	negativ	gleich
SH1.15	0,02	0,15	0,08	0,10	0,15	0,27	0,17	0,13	0	negativ	0		-0,015	negativ	gleich
SH1.16	0,03	0,50	0,07	0,16	0,14	0,39	0,23	0,10	0	negativ	0		-0,004	negativ	gleich
SH1.17	0,04	0,18	0,08	0,11	0,12	0,25	0,22	0,07	0	negativ	0		-0,012	negativ	gleich
SH1.18	0,03	0,20	0,10	0,17	0,44	0,33	0,21	0,19	0	negativ	0		0,027	negativ	gleich
SH1.19	0,11	0,14	0,07	0,17	0,19	0,33	0,23	0,15	0	negativ	0		-0,021	negativ	gleich
SH1.20	0,03	0,12	0,12	0,11	0,15	0,26	0,18	0,10	0	negativ	0		0,007	negativ	gleich
SH1.21	0,04	0,11	0,12	0,16	0,23	0,30	0,26	0,11	0	negativ	0		-0,032	negativ	gleich
SH1.22	0,05	0,20	0,08	0,16	0,12	0,28	0,24	0,07	0	negativ	0		-0,022	negativ	gleich
SH1.23	0,03	0,14	0,08	0,08	0,17	0,34	0,36	0,08	0	negativ	0		-0,021	negativ	gleich
SH1.24	0,02	0,11	0,08	0,08	0,12	0,30	0,16	0,12	0	negativ	0		-0,027	negativ	gleich
SH1.25	0,02	0,24	0,08	0,14	0,11	0,27	0,19	0,36	0	negativ	0		-0,001	negativ	gleich
SH1.26	0,04	0,26	0,20	0,27	0,18	0,67	0,26	0,27	0	negativ	0		0,008	negativ	gleich
SH1.27	0,05	0,23	0,13	0,18	0,15	0,39	0,23	0,13	0	negativ	0		0,001	negativ	gleich
SH1.28	0,03	0,35	0,11	0,47	0,10	0,42	0,20	0,24	0	negativ	0		-0,023	negativ	gleich
SH1.29	0,03	0,18	0,12	0,12	0,13	0,38	0,28	0,11	0	negativ	0		-0,016	negativ	gleich
SH1.30	0,03	0,23	0,13	0,17	0,12	0,44	0,31	0,07	0	negativ	0		-0,010	negativ	gleich
SH1.31	0,02	0,10	0,10	0,12	0,17	0,23	0,31	0,06	0	negativ	0		0,014	negativ	gleich
SH1.32	0,06	0,13	0,20	0,44	0,15	0,36	0,51	0,14	0	negativ	0		0,004	negativ	gleich
SH1.33	0,03	0,20	0,13	0,18	0,12	0,33	0,24	0,10	0	negativ	0		-0,029	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH1.34	0,05	0,19	0,13	0,16	0,20	0,69	0,31	0,20	0	negativ	0		-0,013	negativ	gleich
SH1.35	0,02	0,20	0,33	0,15	0,16	0,28	0,25	0,11	0	negativ	0		-0,032	negativ	gleich
SH1.36	0,03	0,26	0,11	0,12	0,16	0,31	0,48	0,10	0	negativ	0		0,106	negativ	gleich
SH1.37	0,02	0,11	0,18	0,12	0,21	0,20	0,24	0,06	0	negativ	0		0,040	negativ	gleich
SH1.38	0,02	0,16	0,05	0,06	0,10	0,36	0,24	0,14	0	negativ	0		0,070	negativ	gleich
SH1.39	0,02	0,22	0,12	0,50	0,12	0,45	0,37	0,18	0	negativ	0		-0,012	negativ	gleich
SH1.40	0,02	0,20	0,09	0,19	0,13	0,39	0,23	0,17	0	negativ	0		-0,008	negativ	gleich
SH1.41	0,04	0,16	0,07	0,09	0,24	0,38	0,23	0,21	0	negativ	0		0,012	negativ	gleich
SH1.42	0,05	0,34	0,12	0,28	0,18	0,46	0,25	0,12	0	negativ	0		-0,029	negativ	gleich
SH1.43	0,04	0,31	0,11	0,20	0,18	0,24	0,27	0,32	0	negativ	0		0,021	negativ	gleich
SH1.44	0,05	0,38	0,12	0,23	0,13	0,30	0,29	0,07	0	negativ	0		-0,025	negativ	gleich
SH1.45	0,05	0,62	0,08	0,54	0,19	0,25	0,33	0,15	0	negativ	0		0,030	negativ	gleich
SH1.46	0,11	0,12	0,12	0,13	0,10	0,27	0,19	0,09	0	negativ	0		0,018	negativ	gleich
SH1.47	0,03	0,13	0,07	0,08	0,10	0,24	0,22	0,24	0	negativ	0		0,005	negativ	gleich
SH1.48	0,05	0,40	0,11	0,23	0,18	0,46	0,31	0,21	0	negativ	0		-0,012	negativ	gleich
SH1.49	0,07	0,41	0,08	0,16	0,20	0,27	0,29	0,29	0	negativ	0		-0,021	negativ	gleich
SH1.50	0,03	0,32	0,08	0,18	0,15	0,37	0,25	0,17	0	negativ	0		-0,016	negativ	gleich
pseudo1	0,14	0,79	1,14	3,54	0,28	2,30	1,15	1,84	7	positiv	2	Y. pseudotuberculosis	0,789	positiv	gleich
pseudo2	0,03	0,57	0,08	5,10	0,30	0,98	0,56	0,16	3	positiv	0		1,095	positiv	gleich
pseudo3	0,02	1,19	0,11	4,07	0,36	1,27	3,27	1,08	7	positiv	0		1,196	positiv	gleich
Ferkel	0,05	0,17	0,21	0,14	0,22	0,35	0,41	0,21	0	negativ	0		0,028	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
schwein1	0,27	0,54	0,30	2,57	0,61	0,57	0,60	0,13	3	positiv	0		0,794	positiv	gleich
schwein2	0,37	0,54	0,17	1,40	0,74	0,75	6,59	0,24	4	positiv	0		0,855	positiv	gleich
schwein3	0,13	0,61	0,84	3,77	4,38	1,13	1,13	0,36	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,041	positiv	gleich
schwein4	0,18	1,35	0,34	3,32	0,56	0,94	0,51	0,34	4	positiv	0		0,727	positiv	gleich
schwein5	0,15	0,57	0,09	2,26	0,63	0,54	0,42	0,17	3	positiv	0		0,702	positiv	gleich
schwein6	0,09	1,13	0,19	2,04	0,58	1,30	0,73	0,20	5	positiv	0		0,726	positiv	gleich
schwein7	0,08	0,19	0,24	5,00	3,95	1,18	0,68	0,40	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,952	positiv	gleich
schwein8	0,54	0,82	0,30	3,85	1,52	1,08	0,37	0,17	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,903	positiv	gleich
schwein9	0,09	0,25	0,14	0,62	1,12	0,53	0,32	0,22	1	negativ	1		0,229	negativ	gleich
schwein10	0,09	0,54	1,45	4,18	5,40	0,99	0,79	0,30	5	positiv	0		0,813	positiv	gleich
schwein11	0,11	0,61	0,20	2,07	1,04	1,11	0,63	0,22	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,501	positiv	gleich
schwein12	0,04	0,19	0,12	1,14	1,23	0,34	0,65	0,18	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,390	positiv	gleich
schwein13	0,04	0,32	0,47	1,43	3,21	0,31	0,25	0,20	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,402	positiv	gleich
schwein14	0,05	0,58	0,07	0,30	0,21	0,44	0,38	0,16	0	negativ	0		0,264	negativ	gleich
schwein15	0,05	0,96	1,56	2,71	3,36	0,81	0,66	0,65	5	positiv	0		0,695	positiv	gleich
schwein16	0,16	1,12	0,52	3,31	3,00	1,01	0,63	0,31	6	positiv	1	Y. enterocolitica	0,684	positiv	gleich
schwein17	0,11	0,43	0,28	1,24	7,97	1,10	0,48	0,17	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,365	positiv	gleich
schwein18	0,07	1,37	0,23	1,59	1,32	0,30	0,39	0,39	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,211	negativ	abweichend
schwein19	0,24	1,15	0,39	2,62	2,83	1,04	0,40	0,70	6	positiv	1	Y. enterocolitica	0,723	positiv	gleich
schwein20	0,11	1,24	0,69	4,90	3,06	1,65	0,83	0,43	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,043	positiv	gleich
schwein21	0,09	1,74	0,90	2,47	10,09	2,49	0,47	0,53	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,072	positiv	gleich

 positiv  fraglich  abweichend

SERUM

Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
schwein22	0,08	0,96	0,44	4,47	4,42	1,72	1,05	0,56	6	positiv	1	Y. enterocolitica	0,848	positiv	gleich
schwein23	0,04	1,51	0,40	2,61	1,74	1,89	0,48	0,51	6	positiv	1	Y. enterocolitica	0,703	positiv	gleich
schwein24	0,10	0,92	0,66	4,82	7,46	2,43	0,88	0,60	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,884	positiv	gleich
schwein25	0,24	2,16	1,04	5,70	5,42	3,32	0,96	1,46	8	positiv	0		1,219	positiv	gleich
schwein26	0,29	1,51	0,60	5,00	5,76	3,86	1,30	2,06	8	positiv	1	Y. enterocolitica	0,974	positiv	gleich
schwein27	0,28	2,15	0,22	6,49	3,29	4,39	2,00	5,31	8	positiv	1	Y. enterocolitica	1,120	positiv	gleich
schwein28	0,06	0,98	0,28	6,63	1,76	1,26	0,42	0,35	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,291	positiv	gleich
schwein29	0,15	2,05	0,13	4,16	1,61	1,12	0,83	0,54	6	positiv	1	Y. enterocolitica	0,927	positiv	gleich
schwein30	0,11	0,95	0,13	3,04	0,63	0,92	1,11	0,26	4	positiv	0		0,613	positiv	gleich
schwein31	0,16	2,43	0,13	3,88	3,16	1,66	0,62	0,57	6	positiv	1	Y. enterocolitica	0,761	positiv	gleich
schwein32	0,16	1,01	0,43	3,81	2,66	4,75	0,96	1,62	7	positiv	1	Y. enterocolitica	0,985	positiv	gleich
schwein33	0,12	2,09	0,18	2,16	2,02	5,65	0,95	0,14	6	positiv	1	Y. enterocolitica	0,742	positiv	gleich
schwein34	0,10	0,82	0,22	3,79	2,99	1,03	0,56	0,31	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,134	positiv	gleich
schwein35	0,43	3,68	1,14	4,50	11,01	2,51	3,33	2,19	9	positiv	0		1,180	positiv	gleich
schwein36	0,41	3,47	0,34	6,29	4,07	1,52	0,92	1,21	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,021	positiv	gleich
schwein37	0,09	0,98	1,26	6,27	6,21	2,54	1,13	0,64	7	positiv	0		1,265	positiv	gleich
schwein38	0,10	0,99	0,15	5,78	2,25	2,32	1,71	0,17	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,339	positiv	gleich
schwein39	0,07	3,11	1,52	4,54	6,41	6,11	3,25	2,11	9	positiv	0		1,508	positiv	gleich
schwein40	0,06	2,55	1,35	6,77	9,92	6,23	4,77	0,42	8	positiv	0		1,475	positiv	gleich
SH2.1	0,04	0,53	0,09	1,95	0,24	0,52	0,45	0,13	3	positiv	0		0,959	positiv	gleich
SH2.2	0,09	0,23	0,06	6,15	0,32	1,51	0,31	0,18	4	positiv	0		1,601	positiv	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM

Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH2.3	0,06	0,60	0,18	2,48	1,44	2,27	0,76	0,25	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,779	positiv	gleich
SH2.4	0,12	1,28	0,06	4,88	0,34	2,67	1,50	0,57	6	positiv	0		1,100	positiv	gleich
SH2.5	0,07	1,71	0,05	5,40	0,28	1,43	0,88	0,44	5	positiv	0		1,171	positiv	gleich
SH2.6	0,06	0,57	0,22	1,07	2,17	0,72	0,65	0,24	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,231	negativ	abweichend
SH2.7	0,03	0,30	0,32	1,96	1,02	0,74	0,44	2,73	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,528	positiv	gleich
SH2.8	0,05	0,17	0,11	0,25	0,26	0,32	0,30	0,16	0	negativ	0		-0,021	negativ	gleich
SH2.9	0,66	2,10	0,23	4,57	0,19	2,35	1,31	0,77	6	positiv	0		0,882	positiv	gleich
SH2.10	0,24	1,77	0,09	6,97	0,52	1,36	1,59	2,71	7	positiv	0		1,497	positiv	gleich
SH2.11	0,04	0,41	0,12	1,75	0,25	0,39	0,27	0,31	3	positiv	0		0,243	negativ	abweichend
SH2.12	0,10	1,81	3,09	3,99	13,69	1,37	2,25	0,38	8	positiv	0		1,226	positiv	gleich
SH2.13	0,10	1,54	0,09	7,48	0,27	3,31	1,00	0,37	6	positiv	0		1,835	positiv	gleich
SH2.14	0,05	1,05	0,10	8,90	0,39	2,03	2,88	0,51	6	positiv	0		1,726	positiv	gleich
SH2.15	0,03	0,20	0,06	2,27	0,13	0,29	0,25	0,18	3	positiv	0		0,713	positiv	gleich
SH2.16	0,05	0,54	0,09	3,44	0,38	1,70	0,31	0,55	4	positiv	0		1,209	positiv	gleich
SH2.17	0,03	0,39	0,06	0,14	0,55	0,33	0,35	0,27	0	negativ	0		0,006	negativ	gleich
SH2.18	0,05	0,49	0,13	1,78	0,25	0,52	0,26	0,11	3	positiv	0		0,434	positiv	gleich
SH2.19	0,04	0,10	0,07	0,09	0,19	0,57	0,20	0,06	0	negativ	0		0,003	negativ	gleich
SH2.20	0,04	0,85	0,09	0,39	0,46	0,30	0,35	0,52	0	negativ	0		0,102	negativ	gleich
SH2.21	0,04	0,15	0,14	0,34	0,19	0,63	0,25	0,25	0	negativ	0		0,304	positiv	abweichend
SH2.22	0,02	0,15	0,08	0,10	0,13	0,20	0,22	0,14	0	negativ	0		-0,018	negativ	gleich
SH2.23	0,06	0,29	0,18	1,52	1,52	0,45	0,47	0,77	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,387	positiv	gleich

 positiv  fraglich  abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH2.24	0,07	0,12	0,07	0,15	0,13	0,20	0,23	0,09	0	negativ	0		-0,014	negativ	gleich
SH2.25	0,03	0,18	0,06	0,16	0,20	0,48	0,23	0,15	0	negativ	0		-0,021	negativ	gleich
SH2.26	0,03	0,06	0,19	0,08	0,13	0,28	0,20	0,13	0	negativ	0		-0,005	negativ	gleich
SH2.27	0,04	0,18	0,15	0,15	0,15	0,72	0,27	0,19	0	negativ	0		0,131	negativ	gleich
SH2.28	0,03	0,31	0,19	0,32	0,21	0,31	0,26	0,50	0	negativ	0		0,164	negativ	gleich
SH2.29	0,04	0,26	0,22	0,15	0,15	0,76	0,41	0,22	0	negativ	0		0,000	negativ	gleich
SH2.30	0,03	0,30	0,08	0,33	0,18	0,29	0,25	0,12	0	negativ	0		0,015	negativ	gleich
SH2.31	0,03	0,12	0,06	0,20	0,17	0,47	0,27	0,21	0	negativ	0		-0,022	negativ	gleich
SH2.32	0,06	0,45	0,37	3,24	3,53	0,66	0,82	1,51	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,812	positiv	gleich
SH2.33	0,04	0,14	0,06	0,21	0,20	0,37	0,26	0,11	0	negativ	0		-0,001	negativ	gleich
SH2.34	0,06	0,13	0,12	0,15	0,48	0,29	0,25	0,09	0	negativ	0		-0,018	negativ	gleich
SH2.35	0,04	0,07	0,07	0,08	0,15	0,31	0,18	0,11	0	negativ	0		-0,013	negativ	gleich
SH2.36	0,06	1,39	0,86	8,11	5,78	2,00	1,66	0,30	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,580	positiv	gleich
SH2.37	0,07	1,59	0,15	7,06	0,31	2,25	0,73	0,31	5	positiv	0		1,402	positiv	gleich
SH2.38	0,05	0,22	0,06	0,29	0,21	0,26	0,27	0,16	0	negativ	0		-0,029	negativ	gleich
SH2.39	0,04	1,13	0,16	1,70	2,84	0,63	0,69	0,15	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,973	positiv	gleich
SH2.40	0,04	0,36	0,20	0,68	0,24	0,90	1,87	0,12	1	negativ	0		0,179	negativ	gleich
SH2.41	0,05	0,50	0,09	1,62	0,22	0,36	0,42	0,15	3	positiv	0		0,486	positiv	gleich
SH2.42	0,10	0,49	0,32	2,56	0,96	0,81	0,98	0,25	3	positiv	0		0,754	positiv	gleich
SH2.43	0,10	0,42	0,26	0,66	1,76	1,35	0,65	0,35	2	fraglich	1		0,669	positiv	abweichend
SH2.44	0,04	0,48	0,10	1,41	0,53	0,60	0,25	0,16	3	positiv	0		0,883	positiv	gleich
<div><div></div> positiv<div></div> fraglich<div></div> abweichend</div>															

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1							
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19	ELISA						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH2.45	0,05	0,25	0,36	4,38	4,02	0,41	0,40	0,52	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,620	positiv	gleich
SH2.46	0,07	0,33	0,21	2,10	0,23	0,78	0,80	0,23	3	positiv	0		0,837	positiv	gleich
SH2.47	0,04	0,30	0,13	1,13	0,92	0,45	0,21	0,11	3	positiv	0		0,373	positiv	gleich
SH2.48	0,05	0,60	0,19	2,53	0,83	0,90	0,36	0,20	3	positiv	0		0,637	positiv	gleich
SH2.49	0,03	0,20	0,08	0,11	0,10	0,25	0,21	0,07	0	negativ	0		0,051	negativ	gleich
SH2.50	0,04	0,26	0,18	0,12	0,28	0,28	0,27	0,12	0	negativ	0		0,007	negativ	gleich
SH2.51	0,12	1,11	0,11	7,07	0,52	2,67	0,67	0,45	5	positiv	0		1,381	positiv	gleich
SH2.52	0,13	1,61	0,08	4,87	0,18	2,69	1,04	0,55	6	positiv	0		1,120	positiv	gleich
SH2.53	0,10	2,38	0,52	5,11	3,52	4,11	1,37	0,84	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,414	positiv	gleich
SH2.54	0,62	5,12	0,29	8,24	1,05	7,27	7,49	4,23	8	positiv	1	Y. enterocolitica	1,661	positiv	gleich
SH2.55	0,07	3,40	0,19	9,73	2,15	6,26	14,02	3,19	8	positiv	1	Y. enterocolitica	1,879	positiv	gleich
SH2.56	0,07	0,62	0,11	0,16	0,21	0,57	0,30	0,11	0	negativ	0		-0,004	negativ	gleich
SH2.57	0,05	0,18	0,08	0,14	0,17	0,25	0,27	0,19	0	negativ	0		-0,029	negativ	gleich
SH2.58	0,03	0,24	0,06	0,44	0,18	0,27	0,39	0,12	0	negativ	0		-0,013	negativ	gleich
SH2.59	0,04	0,13	0,22	0,16	0,14	0,51	0,24	0,23	0	negativ	0		-0,033	negativ	gleich
SH2.60	0,05	0,17	0,07	0,19	0,39	0,40	0,36	0,12	0	negativ	0		0,027	negativ	gleich
SH3.1	0,03	0,15	0,08	0,16	0,37	0,32	0,25	0,21	0	negativ	0		0,102	negativ	gleich
SH3.2	0,05	0,44	0,14	0,10	0,26	0,56	0,35	0,13	0	negativ	0		-0,023	negativ	gleich
SH3.3	0,14	0,19	0,08	0,45	0,22	0,25	0,40	0,22	0	negativ	0		-0,007	negativ	gleich
SH3.4	0,04	0,13	0,06	0,35	0,16	0,34	0,30	0,15	0	negativ	0		0,148	negativ	gleich
SH3.5	0,04	0,16	0,18	0,14	0,17	0,38	0,28	0,09	0	negativ	0		-0,012	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH3.6	0,04	0,35	0,14	0,16	0,16	0,45	0,31	0,18	0	negativ	0		-0,015	negativ	gleich
SH3.7	0,04	0,32	0,21	0,28	0,18	0,39	0,34	0,32	0	negativ	0		0,030	negativ	gleich
SH3.8	0,03	0,46	0,10	0,19	0,48	0,34	0,31	0,09	0	negativ	0		-0,018	negativ	gleich
SH3.9	0,17	0,27	0,16	0,18	0,28	0,51	0,37	0,21	0	negativ	0		-0,010	negativ	gleich
SH3.10	0,04	0,20	0,12	0,16	0,20	0,25	0,31	0,21	0	negativ	0		-0,019	negativ	gleich
SH3.11	0,03	0,19	0,09	0,08	0,12	0,25	0,30	0,06	0	negativ	0		-0,005	negativ	gleich
SH3.12	0,11	0,29	0,14	0,14	0,19	0,27	0,32	0,21	0	negativ	0		-0,009	negativ	gleich
SH3.13	0,07	0,31	0,10	0,14	0,21	0,29	0,23	0,53	0	negativ	0		-0,003	negativ	gleich
SH3.14	0,07	0,61	0,46	4,42	5,26	1,67	1,22	1,15	7	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,934	positiv	gleich
SH3.15	0,04	0,59	0,43	3,53	2,64	0,92	0,69	0,43	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,783	positiv	gleich
SH3.16	0,10	1,22	0,85	5,58	6,16	1,92	0,77	0,94	6	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,438	positiv	gleich
SH3.17	0,19	3,96	0,46	7,92	2,34	6,78	7,15	2,52	8	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,738	positiv	gleich
SH3.18	0,09	0,90	3,06	5,70	8,55	2,77	2,02	0,68	7	positiv	0		0,994	positiv	gleich
SH3.19	0,13	2,24	0,69	6,91	4,47	2,15	0,87	1,22	7	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,296	positiv	gleich
SH3.20	0,12	1,49	1,52	5,67	11,35	1,39	0,66	0,17	7	positiv	0		1,087	positiv	gleich
SH3.21	0,07	1,34	0,35	5,03	3,64	1,30	0,85	0,18	6	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,116	positiv	gleich
SH3.22	0,21	1,43	0,64	3,17	5,68	1,43	1,35	0,50	7	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,943	positiv	gleich
SH3.23	0,27	1,57	0,46	6,96	6,70	1,99	0,59	0,48	6	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,522	positiv	gleich
SH3.24	0,07	0,74	0,30	5,91	4,57	1,95	0,58	0,62	5	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,300	positiv	gleich
SH3.25	0,26	2,38	0,54	9,88	6,44	7,11	1,76	1,33	8	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,333	positiv	gleich
SH3.26	0,08	0,49	0,23	3,94	0,29	0,65	0,27	0,43	3	positiv	0		0,323	positiv	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH3.27	0,20	2,22	2,35	6,46	13,36	1,24	2,22	0,33	8	positiv	0		1,575	positiv	gleich
SH3.28	0,08	1,76	0,31	10,08	4,27	3,43	1,03	0,14	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,575	positiv	gleich
SH3.29	0,04	0,15	0,09	0,44	0,16	0,27	0,36	0,44	0	negativ	0		-0,011	negativ	gleich
SH3.30	0,08	1,17	0,29	8,07	3,98	1,10	0,84	0,30	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,518	positiv	gleich
SH3.31	0,07	2,03	0,15	8,09	0,29	10,53	0,70	1,55	6	positiv	0		1,451	positiv	gleich
SH3.32	0,62	3,69	0,25	6,28	1,14	4,93	6,04	0,79	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,663	positiv	gleich
SH3.33	0,06	1,40	1,53	3,77	8,76	1,20	0,57	0,51	7	positiv	0		1,026	positiv	gleich
SH3.34	0,25	1,44	1,69	9,81	13,28	4,66	1,70	1,49	9	positiv	0		1,823	positiv	gleich
SH3.35	0,10	1,71	0,92	6,39	8,05	2,48	1,17	0,53	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,530	positiv	gleich
SH3.36	0,15	0,64	0,26	7,83	6,07	1,38	0,64	2,23	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,569	positiv	gleich
SH3.37	0,22	1,21	0,84	7,79	5,86	2,82	1,11	0,93	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,464	positiv	gleich
SH3.38	1,47	1,09	0,44	4,29	4,05	2,47	1,45	0,40	8	positiv	1	Y. enterocolitica	1,044	positiv	gleich
SH3.39	1,86	5,51	0,42	12,57	3,42	10,17	3,95	7,09	9	positiv	1	Y. enterocolitica	1,781	positiv	gleich
SH3.40	0,06	0,18	0,13	0,32	0,25	0,37	0,39	0,23	0	negativ	0		0,009	negativ	gleich
SH3.41	0,12	4,34	0,82	8,50	9,93	7,02	2,93	0,93	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,750	positiv	gleich
SH3.42	0,11	0,89	0,15	6,04	1,02	3,32	0,42	0,24	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,170	positiv	gleich
SH3.43	0,09	1,88	0,11	6,53	1,17	4,05	3,00	1,30	8	positiv	1	Y. enterocolitica	1,589	positiv	gleich
SH3.44	0,35	0,82	0,19	5,09	0,78	4,28	1,23	0,59	5	positiv	0		1,228	positiv	gleich
SH3.45	0,04	0,17	0,08	0,22	0,13	0,39	1,49	0,14	1	negativ	0		-0,003	negativ	gleich
SH3.46	0,04	1,05	0,08	4,87	0,22	0,54	0,28	0,25	4	positiv	0		0,688	positiv	gleich
SH3.47	0,05	0,26	0,10	3,46	0,26	0,61	1,62	0,12	4	positiv	0		0,362	positiv	gleich
		positiv	fraglich		abweichend										

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM

Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH3.48	0,04	0,31	0,22	0,54	0,19	0,44	0,50	0,28	0	negativ	0		0,067	negativ	gleich
SH3.49	0,19	3,16	0,12	4,59	0,21	2,66	3,26	8,09	7	positiv	0		1,075	positiv	gleich
SH3.50	0,10	2,18	0,22	9,40	5,56	8,76	4,90	0,94	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,547	positiv	gleich
SH3.51	0,78	4,49	0,08	8,13	0,18	14,23	8,75	9,50	7	positiv	0		1,827	positiv	gleich
SH3.52	0,32	1,85	0,26	8,54	6,94	1,98	3,08	0,61	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,795	positiv	gleich
SH3.53	0,12	0,61	0,43	7,76	5,45	2,22	1,05	0,24	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,474	positiv	gleich
SH3.54	0,05	0,18	0,09	0,27	0,18	0,39	0,39	0,21	0	negativ	0		-0,022	negativ	gleich
SH3.55	0,08	0,35	0,17	4,64	0,15	1,12	0,29	0,23	4	positiv	0		1,153	positiv	gleich
SH3.56	0,06	0,69	0,42	4,35	5,08	1,22	1,29	1,10	7	positiv	1	Y. enterocolitica	0,949	positiv	gleich
SH3.57	0,28	2,29	0,60	7,53	5,30	0,83	1,42	1,37	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,469	positiv	gleich
SH3.58	0,42	2,32	1,49	4,02	4,52	4,92	1,75	0,64	8	positiv	0		1,279	positiv	gleich
SH3.59	0,03	0,15	0,14	0,15	0,17	0,32	0,32	0,29	0	negativ	0		0,007	negativ	gleich
SH3.60	0,06	1,90	0,10	6,68	1,06	1,56	0,72	0,22	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,414	positiv	gleich
SH3.61	0,07	0,27	0,41	0,26	0,25	0,60	0,47	0,25	0	negativ	0		0,010	negativ	gleich
SH3.62	0,06	0,31	0,09	0,20	0,17	0,54	0,30	0,11	0	negativ	0		0,018	negativ	gleich
SH3.63	0,05	0,16	0,09	0,10	0,20	0,29	0,34	0,19	0	negativ	0		0,003	negativ	gleich
SH3.64	0,04	0,11	0,11	0,21	0,16	0,16	0,24	0,16	0	negativ	0		0,095	negativ	gleich
SH3.65	0,07	0,16	0,09	0,24	0,18	0,53	0,24	0,21	0	negativ	0		-0,019	negativ	gleich
SH3.66	0,06	0,16	0,10	0,14	0,19	0,37	0,35	0,09	0	negativ	0		-0,016	negativ	gleich
SH3.67	0,13	1,05	0,09	5,87	0,26	1,58	1,11	1,06	7	positiv	0		1,234	positiv	gleich
SH3.68	0,06	0,18	0,07	0,48	0,20	0,43	0,31	0,26	0	negativ	0		0,003	negativ	gleich

 positiv  fraglich  abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH3.69	0,05	0,13	0,07	0,13	0,12	0,23	0,30	0,09	0	negativ	0		-0,019	negativ	gleich
SH3.70	0,04	0,14	0,10	0,12	0,14	0,28	0,29	0,08	0	negativ	0		0,030	negativ	gleich
SH3.71	0,10	1,02	3,12	5,99	9,07	3,24	2,00	0,79	8	positiv	0		0,883	positiv	gleich
SH3.72	0,06	0,16	0,15	0,14	0,21	0,21	0,25	0,12	0	negativ	0		0,007	negativ	gleich
SH3.73	0,07	0,50	0,11	0,23	0,29	0,36	0,36	0,32	0	negativ	0		-0,011	negativ	gleich
SH3.74	0,07	0,22	0,15	0,47	0,39	0,63	0,55	0,24	0	negativ	0		-0,017	negativ	gleich
SH3.75	0,07	0,30	0,15	0,34	0,30	0,78	0,38	0,22	0	negativ	0		-0,003	negativ	gleich
SH3.76	0,04	0,24	0,09	0,29	0,21	0,63	0,33	0,17	0	negativ	0		-0,007	negativ	gleich
SH3.77	0,36	0,22	0,16	0,20	0,29	0,40	0,58	0,09	0	negativ	0		-0,018	negativ	gleich
SH3.78	0,04	0,09	0,07	0,16	0,12	0,19	0,22	0,11	0	negativ	0		0,040	negativ	gleich
SH3.79	0,04	1,31	0,08	0,40	0,12	0,30	0,37	0,22	1	negativ	0		0,075	negativ	gleich
SH4.1	0,14	1,21	0,10	4,44	0,43	4,02	0,99	0,46	5	positiv	0		1,407	positiv	gleich
SH4.2	0,09	1,34	0,79	2,15	9,16	0,76	0,96	0,60	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,851	positiv	gleich
SH4.3	0,05	0,64	0,43	4,56	6,61	0,46	0,51	0,13	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,098	positiv	gleich
SH4.4	0,10	2,27	1,48	8,31	11,77	2,88	1,60	0,66	8	positiv	0		1,539	positiv	gleich
SH4.5	0,05	1,77	0,11	2,77	0,35	1,73	1,95	0,90	6	positiv	0		1,026	positiv	gleich
SH4.6	0,08	1,35	0,16	2,19	0,62	1,56	0,89	0,34	5	positiv	0		0,645	positiv	gleich
SH4.7	0,24	3,35	0,21	5,97	1,28	1,21	2,71	1,01	8	positiv	1	Y. enterocolitica	1,179	positiv	gleich
SH4.8	0,19	2,85	0,64	7,61	6,38	2,25	0,66	0,30	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,570	positiv	gleich
SH4.9	0,07	2,93	0,36	5,01	2,39	1,42	1,30	0,45	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,132	positiv	gleich
SH4.10	0,28	0,86	0,40	5,24	2,91	3,00	0,95	0,87	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,242	positiv	gleich

 positiv
 fraglich
 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH4.11	0,10	2,16	0,21	3,19	4,98	2,11	3,07	0,90	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,180	positiv	gleich
SH4.12	0,09	0,77	0,77	1,62	8,20	0,84	0,55	0,25	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,542	positiv	gleich
SH4.13	0,08	1,15	0,16	2,58	0,72	0,87	0,53	0,21	4	positiv	0		0,788	positiv	gleich
SH4.14	0,08	1,76	0,29	2,33	1,46	2,31	0,89	0,33	6	positiv	1	Y. enterocolitica	0,574	positiv	gleich
SH4.15	0,11	3,40	1,11	3,42	10,93	2,23	0,80	0,28	7	positiv	0		1,111	positiv	gleich
SH4.16	0,10	1,78	0,42	4,31	1,45	3,85	1,50	0,52	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,111	positiv	gleich
SH4.17	0,42	1,90	0,41	3,53	4,88	4,79	2,71	0,44	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,467	positiv	gleich
SH4.18	0,08	0,80	0,28	5,65	3,51	0,40	0,53	0,29	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,932	positiv	gleich
SH4.19	0,09	2,57	1,48	4,16	4,48	2,20	3,37	1,44	9	positiv	0		1,152	positiv	gleich
SH4.21	0,11	1,69	0,27	3,63	1,38	1,23	0,89	0,44	6	positiv	1	Y. enterocolitica	0,719	positiv	gleich
SH4.22	0,04	1,04	0,57	4,84	6,70	1,06	1,49	0,68	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,006	positiv	gleich
SH4.23	0,06	0,65	0,32	5,78	5,17	1,09	1,52	0,32	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,151	positiv	gleich
SH4.24	0,10	0,52	0,18	1,36	1,41	1,48	0,56	0,10	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,655	positiv	gleich
SH4.25	0,21	1,37	0,93	3,57	5,37	0,73	0,62	0,45	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,884	positiv	gleich
SH4.26	0,19	3,56	0,53	3,59	6,18	1,28	3,90	0,61	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,110	positiv	gleich
SH4.27	0,03	0,16	0,08	0,21	0,16	0,26	0,28	0,29	0	negativ	0		0,006	negativ	gleich
SH4.28	0,05	1,49	0,76	5,23	4,66	4,17	1,05	0,82	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,388	positiv	gleich
SH4.29	0,06	1,05	0,11	4,69	0,21	2,52	0,95	0,34	5	positiv	0		1,202	positiv	gleich
SH4.30	0,07	1,38	0,24	2,16	3,18	1,45	1,11	0,47	7	positiv	1	Y. enterocolitica	0,695	positiv	gleich
SH4.31	0,04	0,48	0,48	3,05	2,61	0,70	0,66	0,11	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,656	positiv	gleich
SH4.32	0,11	0,59	1,17	7,19	7,59	4,30	1,83	0,35	7	positiv	0		1,169	positiv	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM

Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH4.33	0,11	1,00	0,50	3,26	4,92	6,19	1,89	0,40	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,241	positiv	gleich
SH4.34	0,11	2,19	0,14	1,43	0,28	1,59	1,49	0,30	6	positiv	0		0,561	positiv	gleich
SH4.35	0,07	1,13	0,71	7,96	7,06	1,62	1,48	0,32	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,399	positiv	gleich
SH4.36	0,09	0,43	0,28	3,85	6,07	0,59	0,59	0,23	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,788	positiv	gleich
SH4.37	0,37	0,83	0,50	4,19	2,17	3,38	1,10	2,16	7	positiv	1	Y. enterocolitica	0,971	positiv	gleich
SH4.38	0,07	1,17	0,13	7,53	1,21	2,34	0,61	0,23	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,255	positiv	gleich
SH4.39	0,05	0,45	0,14	0,31	0,27	0,26	0,27	0,35	0	negativ	0		0,011	negativ	gleich
SH4.40	0,04	0,41	0,08	5,64	0,45	2,17	0,40	0,17	4	positiv	0		1,205	positiv	gleich
SH4.41	0,31	1,52	0,07	3,80	0,20	2,00	0,98	0,26	5	positiv	0		1,157	positiv	gleich
SH4.42	0,10	0,51	0,10	1,49	0,31	1,35	1,07	0,32	5	positiv	0		0,488	positiv	gleich
SH4.43	0,05	0,88	0,10	8,74	0,94	1,77	0,71	0,09	4	positiv	0		1,724	positiv	gleich
SH4.44	0,27	1,58	0,11	6,01	0,72	1,51	0,54	0,43	5	positiv	0		0,812	positiv	gleich
SH4.45	0,18	1,09	0,18	9,74	0,53	4,58	0,64	0,28	5	positiv	0		1,640	positiv	gleich
SH4.46	0,04	0,27	0,16	0,15	0,24	0,65	0,58	0,08	0	negativ	0		0,084	negativ	gleich
SH4.47	0,36	1,13	0,06	7,62	0,54	1,70	2,78	0,51	6	positiv	0		1,317	positiv	gleich
SH4.48	0,67	1,70	0,15	10,13	3,74	5,36	1,03	0,52	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,627	positiv	gleich
SH4.49	0,11	0,46	0,14	0,28	0,15	0,42	0,39	0,20	0	negativ	0		-0,014	negativ	gleich
SH4.50	0,03	0,20	0,24	0,13	0,20	0,27	0,33	0,16	0	negativ	0		-0,014	negativ	gleich
SH4.51	0,05	0,27	0,13	0,24	0,22	0,27	0,37	0,27	0	negativ	0		0,015	negativ	gleich
SH4.52	0,05	0,28	0,17	0,30	0,35	0,35	0,34	0,46	0	negativ	0		-0,016	negativ	gleich
SH4.53	0,07	0,55	0,16	0,24	0,22	0,32	0,37	0,35	0	negativ	0		0,002	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH4.554	0,05	0,33	0,10	0,19	0,17	0,36	0,32	0,18	0	negativ	0		-0,022	negativ	gleich
SH4.55	0,03	0,24	0,10	0,14	0,15	0,26	0,30	0,14	0	negativ	0		-0,023	negativ	gleich
SH4.56	0,04	0,41	0,15	0,19	0,38	0,39	0,35	0,27	0	negativ	0		0,014	negativ	gleich
SH4.57	0,05	0,45	0,14	0,13	0,32	0,41	0,32	0,41	0	negativ	0		-0,021	negativ	gleich
SH4.58	0,05	0,36	0,15	0,16	0,16	0,50	0,28	0,35	0	negativ	0		0,037	negativ	gleich
SH4.59	0,05	0,28	0,13	0,17	0,23	0,36	1,30	0,13	1	negativ	0		0,004	negativ	gleich
SH4.60	0,04	0,24	0,09	0,23	0,17	0,15	0,29	0,11	0	negativ	0		-0,017	negativ	gleich
SH4.61	0,05	0,46	0,24	0,29	0,35	0,45	0,50	0,60	0	negativ	0		0,016	negativ	gleich
SH4.62	0,10	3,02	0,14	4,72	0,20	1,43	2,95	0,88	6	positiv	0		1,056	positiv	gleich
SH4.63	0,17	0,32	0,63	3,70	5,50	1,34	0,58	0,17	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,970	positiv	gleich
SH4.64	0,17	2,18	0,38	6,27	4,20	1,27	1,51	0,49	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,137	positiv	gleich
SH4.65	0,05	2,59	0,10	10,06	0,37	5,06	2,39	0,20	6	positiv	0		1,777	positiv	gleich
SH4.66	0,46	1,25	0,84	6,69	4,02	2,69	0,67	0,14	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,200	positiv	gleich
SH4.67	0,15	0,52	0,18	7,42	2,95	1,40	0,96	0,16	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,203	positiv	gleich
SH4.68	0,06	0,30	0,10	2,29	1,15	0,79	0,52	0,17	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,446	positiv	gleich
SH4.69	0,16	1,75	0,53	3,69	3,86	2,59	1,28	0,49	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,111	positiv	gleich
SH4.70	0,13	0,99	0,39	1,92	4,35	1,41	2,25	0,95	6	positiv	1	Y. enterocolitica	0,819	positiv	gleich
SH4.71	0,23	0,38	0,54	3,08	4,18	1,40	0,74	0,30	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,050	positiv	gleich
SH4.72	0,20	2,33	1,56	4,95	10,66	1,04	2,28	0,45	8	positiv	0		1,136	positiv	gleich
SH4.73	0,20	1,87	0,68	6,47	7,79	0,93	0,90	0,57	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,211	positiv	gleich
SH4.74	0,08	0,80	0,83	5,30	5,42	2,69	1,21	0,49	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,249	positiv	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM

Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH4.75	0,25	1,96	1,69	5,57	11,75	1,76	1,19	0,18	8	positiv	0		1,246	positiv	gleich
SH4.76	0,04	0,49	0,06	3,60	1,90	0,34	0,79	0,20	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,017	positiv	gleich
SH4.77	0,29	1,70	0,28	5,91	3,60	2,75	1,73	0,52	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,298	positiv	gleich
SH4.78	0,08	0,60	0,54	3,48	4,00	0,75	0,31	0,18	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,064	positiv	gleich
SH4.79	0,08	0,45	5,07	4,28	11,47	1,06	0,40	0,23	6	positiv	0		0,873	positiv	gleich
SH4.80	0,04	0,18	0,08	0,13	0,17	0,35	0,27	0,07	0	negativ	0		-0,011	negativ	gleich
SH4.81	0,05	0,29	0,09	0,15	0,15	0,28	0,31	0,15	0	negativ	0		-0,015	negativ	gleich
SH4.82	0,07	0,24	0,14	0,19	0,28	0,60	0,30	0,10	0	negativ	0		0,007	negativ	gleich
SH4.83	0,03	0,38	0,09	0,33	0,13	0,37	0,28	0,10	0	negativ	0		0,007	negativ	gleich
SH4.84	0,02	0,18	0,09	0,15	0,21	0,39	0,34	0,16	0	negativ	0		-0,015	negativ	gleich
SH4.85	0,05	0,21	0,07	0,18	0,31	0,38	0,30	0,17	0	negativ	0		0,002	negativ	gleich
SH4.86	0,06	0,28	0,11	0,27	0,20	0,27	0,38	0,23	0	negativ	0		-0,011	negativ	gleich
SH4.87	0,04	0,42	0,09	0,37	0,22	0,52	0,45	0,13	0	negativ	0		-0,001	negativ	gleich
SH4.88	0,05	0,36	0,08	0,15	0,24	0,66	0,29	0,12	0	negativ	0		-0,020	negativ	gleich
SH4.89	0,03	0,40	0,14	0,14	0,15	0,30	0,26	0,10	0	negativ	0		-0,020	negativ	gleich
SH4.90	0,05	0,25	0,09	0,14	0,30	0,46	0,30	0,14	0	negativ	0		-0,018	negativ	gleich
SH4.91	0,10	0,19	0,12	0,14	0,47	0,33	0,56	0,22	0	negativ	0		0,025	negativ	gleich
SH4.92	0,05	0,23	0,10	0,12	0,32	0,32	0,34	0,15	0	negativ	0		-0,004	negativ	gleich
SH4.93	0,04	0,15	0,08	0,10	0,28	0,19	0,26	0,09	0	negativ	0		-0,012	negativ	gleich
SH4.94	0,05	0,35	0,09	0,16	0,23	0,47	0,33	0,19	0	negativ	0		-0,022	negativ	gleich
SH4.95	0,04	0,58	0,10	0,14	0,25	0,36	0,28	0,15	0	negativ	0		-0,015	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH4.96	0,05	0,31	0,10	0,21	0,30	0,58	0,31	0,32	0	negativ	0		0,006	negativ	gleich
SH4.97	0,04	0,33	0,11	0,10	0,33	0,24	0,29	0,13	0	negativ	0		-0,014	negativ	gleich
SH4.98	0,06	0,36	0,36	0,21	0,17	0,31	0,32	0,09	0	negativ	0		-0,011	negativ	gleich
SH4.99	0,07	0,33	0,08	0,17	0,20	0,45	0,37	0,11	0	negativ	0		-0,007	negativ	gleich
SH4.100	0,05	0,22	0,09	0,21	0,16	0,42	0,26	0,11	0	negativ	0		-0,005	negativ	gleich
SH5.1	0,17	1,27	0,82	7,88	7,46	3,32	2,24	0,40	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,710	positiv	gleich
SH5.2	2,11	2,75	1,55	7,60	9,32	4,08	3,26	3,54	10	positiv	0		1,444	positiv	gleich
SH5.3	0,21	2,01	0,36	9,61	1,78	2,66	1,58	0,15	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,619	positiv	gleich
SH5.4	0,25	1,93	0,07	5,22	0,25	2,96	1,49	0,82	6	positiv	0		1,293	positiv	gleich
SH5.5	0,29	0,85	0,09	5,92	0,48	2,15	0,95	0,37	4	positiv	0		1,369	positiv	gleich
SH5.6	0,14	2,74	0,44	5,88	3,02	3,46	1,47	0,65	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,222	positiv	gleich
SH5.7	0,30	3,01	0,11	10,62	0,72	6,44	2,52	1,09	7	positiv	0		1,956	positiv	gleich
SH5.8	0,07	0,94	0,07	2,74	0,31	1,54	1,04	0,53	5	positiv	0		0,993	positiv	gleich
SH5.9	0,85	2,97	0,77	6,48	5,88	5,46	5,10	2,09	8	positiv	1	Y. enterocolitica	1,579	positiv	gleich
SH5.10	0,35	2,18	1,19	7,83	8,29	1,54	2,15	1,05	9	positiv	0		1,707	positiv	gleich
SH5.11	0,11	1,22	0,11	5,15	2,64	3,27	1,33	0,76	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,489	positiv	gleich
SH5.12	0,33	3,09	0,24	10,16	0,50	5,95	3,19	0,77	6	positiv	0		1,742	positiv	gleich
SH5.13	0,19	3,29	1,41	6,63	9,49	1,95	1,78	0,89	8	positiv	0		1,254	positiv	gleich
SH5.14	0,46	2,66	0,14	8,59	0,25	2,36	1,00	0,57	6	positiv	0		1,451	positiv	gleich
SH5.15	0,05	0,15	0,08	0,22	0,16	0,19	0,29	0,13	0	negativ	0		-0,020	negativ	gleich
SH5.16	0,04	0,52	0,23	0,21	0,24	0,28	0,38	0,14	0	negativ	0		-0,015	negativ	gleich

 positiv
 fraglich
 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH5.17	0,03	0,22	0,11	0,22	0,20	0,41	0,28	0,13	0	negativ	0		-0,017	negativ	gleich
SH5.18	0,05	0,23	0,10	0,22	0,21	0,28	0,30	0,11	0	negativ	0		-0,004	negativ	gleich
SH5.19	0,04	0,19	0,08	0,14	0,19	0,25	0,33	0,09	0	negativ	0		-0,010	negativ	gleich
SH5.20	0,05	0,19	0,14	0,24	0,13	0,24	0,33	0,12	0	negativ	0		0,002	negativ	gleich
SH5.21	0,04	0,25	0,12	0,20	0,22	0,45	0,41	0,08	0	negativ	0		0,064	negativ	gleich
SH5.22	0,09	0,26	0,10	0,15	0,21	0,27	0,47	0,13	0	negativ	0		-0,011	negativ	gleich
SH5.23	0,03	0,14	0,09	0,14	0,12	0,14	0,34	0,12	0	negativ	0		0,000	negativ	gleich
SH5.24	0,03	0,44	0,09	0,15	0,23	0,27	0,40	0,11	0	negativ	0		0,026	negativ	gleich
SH5.25	0,04	0,30	0,08	0,11	0,15	0,22	0,35	0,07	0	negativ	0		0,015	negativ	gleich
SH5.26	0,06	0,31	0,16	0,25	0,37	0,37	0,45	0,41	0	negativ	0		-0,018	negativ	gleich
SH5.27	0,04	0,52	0,08	0,27	0,23	0,30	0,33	0,10	0	negativ	0		-0,012	negativ	gleich
SH5.28	0,08	0,28	0,11	0,14	0,19	0,25	0,32	0,21	0	negativ	0		-0,005	negativ	gleich
SH5.29	0,03	0,30	0,16	0,20	0,13	0,33	0,34	0,15	0	negativ	0		-0,007	negativ	gleich
SH5.30	0,05	0,22	0,08	0,17	0,19	0,23	0,36	0,26	0	negativ	0		0,005	negativ	gleich
SH5.31	0,09	0,12	0,13	0,40	0,37	0,42	0,47	0,47	0	negativ	0		0,056	negativ	gleich
SH5.32	0,08	0,45	0,08	0,15	0,17	0,26	0,33	0,19	0	negativ	0		-0,014	negativ	gleich
SH5.33	0,06	0,25	0,15	0,18	0,27	0,30	0,34	0,18	0	negativ	0		-0,006	negativ	gleich
SH5.34	0,08	0,29	0,15	0,22	0,27	0,36	0,34	0,63	0	negativ	0		-0,002	negativ	gleich
SH5.35	0,14	0,29	0,33	0,39	0,16	0,28	0,27	0,12	0	negativ	0		-0,008	negativ	gleich
SH5.36	0,08	0,70	0,11	0,33	0,23	0,33	0,41	0,24	0	negativ	0		-0,011	negativ	gleich
SH5.37	0,03	0,37	0,05	0,15	0,19	0,18	0,34	0,11	0	negativ	0		0,080	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH5.38	0,10	0,28	0,10	0,13	0,36	0,29	0,41	0,17	0	negativ	0		0,042	negativ	gleich
SH5.39	0,04	0,63	0,09	0,28	0,19	0,60	0,35	0,07	0	negativ	0		0,029	negativ	gleich
SH5.40	0,17	0,34	0,06	0,17	0,16	0,19	0,26	0,08	0	negativ	0		0,032	negativ	gleich
SH5.41	0,05	0,33	0,11	0,30	0,23	0,43	0,47	0,13	0	negativ	0		0,056	negativ	gleich
SH5.42	0,05	0,25	0,16	0,13	0,15	0,25	0,31	0,07	0	negativ	0		0,040	negativ	gleich
SH5.43	0,08	0,25	0,10	0,15	0,24	0,33	0,27	0,10	0	negativ	0		0,029	negativ	gleich
SH5.44	0,05	0,19	0,07	0,14	0,21	0,22	0,31	0,08	0	negativ	0		0,043	negativ	gleich
SH5.45	0,07	0,28	0,09	0,13	0,17	0,22	0,28	0,11	0	negativ	0		0,023	negativ	gleich
SH5.46	0,04	0,33	0,15	0,15	0,17	0,62	0,33	0,14	0	negativ	0		0,176	negativ	gleich
SH5.47	0,07	0,08	0,07	0,15	0,14	0,20	0,31	0,11	0	negativ	0		0,029	negativ	gleich
SH5.48	0,04	0,56	0,12	0,18	0,20	0,24	0,33	0,23	0	negativ	0		0,020	negativ	gleich
SH5.49	0,05	0,26	0,13	1,78	0,23	0,97	0,37	0,17	3	positiv	0		0,796	positiv	gleich
SH5.50	0,06	0,43	0,11	7,08	0,21	0,45	0,46	0,13	3	positiv	0		1,270	positiv	gleich
SH5.51	0,05	0,76	0,08	3,21	0,18	1,12	0,66	0,24	4	positiv	0		1,042	positiv	gleich
SH5.52	0,03	1,12	0,16	1,57	0,82	1,54	1,02	0,14	6	positiv	0		1,052	positiv	gleich
SH5.53	0,09	1,35	0,11	7,26	0,35	0,85	0,59	0,27	4	positiv	0		0,824	positiv	gleich
SH5.54	0,14	2,36	1,64	6,79	8,67	1,78	1,07	0,24	8	positiv	0		0,931	positiv	gleich
SH5.55	0,23	1,12	0,15	3,58	0,54	1,20	0,66	0,21	5	positiv	0		0,482	positiv	gleich
SH5.56	0,06	0,73	0,26	2,72	2,11	0,52	0,50	0,52	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,665	positiv	gleich
SH5.57	0,03	0,30	0,70	2,77	5,82	0,48	0,36	0,19	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,750	positiv	gleich
SH5.58	0,18	3,58	0,15	8,93	4,28	4,37	4,39	1,92	8	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,657	positiv	gleich

 positiv
 fraglich
 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH5.59	0,11	1,42	0,35	3,42	3,67	0,58	0,61	0,38	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,976	positiv	gleich
SH5.60	0,04	0,96	0,42	4,07	3,74	3,26	0,48	0,41	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,255	positiv	gleich
SH5.61	0,05	0,22	0,09	0,32	0,21	0,31	0,34	0,33	0	negativ	0		0,011	negativ	gleich
SH5.62	0,06	0,27	0,09	0,36	0,20	0,40	0,32	0,29	0	negativ	0		0,017	negativ	gleich
SH5.63	0,04	0,39	0,09	0,33	0,22	0,66	0,35	0,33	0	negativ	0		0,025	negativ	gleich
SH5.64	0,03	0,33	0,11	0,18	0,18	0,28	0,30	2,92	1	negativ	0		-0,017	negativ	gleich
SH5.65	0,05	0,37	0,15	0,28	0,27	0,46	0,41	0,31	0	negativ	0		-0,003	negativ	gleich
SH5.66	0,05	0,71	0,14	0,14	0,17	0,52	0,33	0,22	0	negativ	0		-0,006	negativ	gleich
SH5.67	0,06	0,40	0,08	0,14	0,12	0,26	0,39	0,15	0	negativ	0		0,013	negativ	gleich
SH5.68	0,04	0,26	0,05	0,13	0,14	0,20	0,33	0,12	0	negativ	0		0,028	negativ	gleich
SH5.69	0,03	0,27	0,15	0,20	0,15	0,28	0,32	0,10	0	negativ	0		0,041	negativ	gleich
SH5.70	0,05	0,25	0,13	0,28	0,19	0,19	0,34	0,11	0	negativ	0		0,042	negativ	gleich
SH5.71	0,05	0,44	0,13	0,22	0,48	0,58	0,37	0,15	0	negativ	0		0,148	negativ	gleich
SH5.72	0,07	0,62	0,46	0,37	0,17	1,18	0,47	0,29	1	negativ	0		-0,024	negativ	gleich
SH5.73	0,04	0,28	0,31	0,12	0,15	0,22	0,31	0,27	0	negativ	0		-0,011	negativ	gleich
SH5.74	0,07	0,39	0,73	0,36	0,41	2,98	0,39	0,21	1	negativ	0		0,013	negativ	gleich
SH5.75	0,05	0,48	0,18	0,30	0,15	0,29	0,43	0,20	0	negativ	0		0,020	negativ	gleich
SH5.76	0,02	0,15	0,05	0,15	0,10	0,14	0,27	0,06	0	negativ	0		0,024	negativ	gleich
SH5.77	0,03	0,18	0,10	0,27	0,12	0,33	0,25	0,09	0	negativ	0		0,082	negativ	gleich
SH5.78	0,05	0,35	0,08	0,21	0,21	0,49	0,31	0,37	0	negativ	0		0,024	negativ	gleich
SH5.79	0,02	0,27	0,13	0,31	0,11	0,22	0,25	0,16	0	negativ	0		0,028	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH5.80	0,07	0,60	0,12	0,19	0,21	0,53	0,39	0,16	0	negativ	0		-0,020	negativ	gleich
SH5.81	0,05	0,35	0,10	0,12	0,24	0,33	0,37	0,38	0	negativ	0		0,066	negativ	gleich
SH5.82	0,03	0,50	0,07	0,23	0,16	0,35	0,28	0,14	0	negativ	0		0,072	negativ	gleich
SH5.83	0,05	0,33	0,09	0,17	0,24	0,23	0,28	0,11	0	negativ	0		0,028	negativ	gleich
SH5.84	0,03	1,02	0,06	0,12	0,17	0,34	0,32	0,09	1	negativ	0		-0,015	negativ	gleich
SH5.85	0,06	0,30	0,11	0,25	0,19	0,47	0,27	0,12	0	negativ	0		0,032	negativ	gleich
SH5.86	0,08	0,30	0,07	0,18	0,37	0,26	0,33	0,13	0	negativ	0		0,021	negativ	gleich
SH5.87	0,05	0,28	0,08	0,59	0,32	0,62	0,45	0,13	0	negativ	0		0,217	negativ	gleich
SH5.88	0,10	1,61	0,81	2,65	6,51	1,99	1,87	0,21	7	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,955	positiv	gleich
SH5.89	0,11	0,59	0,24	2,87	1,74	0,82	0,93	0,34	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,804	positiv	gleich
SH5.90	0,05	0,74	0,30	4,70	5,71	0,62	0,48	0,17	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,103	positiv	gleich
SH5.91	0,04	0,88	0,26	3,24	3,77	0,43	0,55	0,11	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,730	positiv	gleich
SH5.92	0,20	1,01	4,86	5,48	12,95	0,74	0,96	0,24	6	positiv	0		0,707	positiv	gleich
SH5.93	0,05	0,63	2,22	2,69	6,25	0,53	0,40	0,22	5	positiv	0		0,456	positiv	gleich
SH5.94	0,42	2,10	0,47	4,77	3,55	2,95	5,56	0,98	7	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,669	positiv	gleich
SH5.95	0,29	0,71	0,52	3,29	3,30	0,54	0,33	0,28	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,409	positiv	gleich
SH5.96	0,11	0,71	0,26	3,07	2,37	1,65	1,64	0,46	6	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,352	positiv	gleich
SH5.97	0,08	1,11	0,68	5,83	7,90	0,60	0,60	0,66	5	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,708	positiv	gleich
SH5.98	0,13	1,67	0,33	4,53	4,11	1,66	0,69	0,23	6	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,558	positiv	gleich
SH5.99	0,06	3,08	0,19	2,82	1,90	2,42	1,54	0,30	7	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,536	positiv	gleich
SH5.100	0,13	1,79	0,66	4,47	5,45	1,43	2,31	0,23	7	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,702	positiv	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM

Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH6.1	0,07	0,20	0,06	3,52	0,16	0,35	0,31	0,08	3	positiv	0		0,409	positiv	gleich
SH6.2	0,07	0,16	0,14	0,84	0,52	1,03	0,35	0,59	1	negativ	0		0,297	negativ	gleich
SH6.3	0,05	2,44	0,58	2,47	6,77	0,67	1,38	0,52	6	positiv	1	Y. enterocolitica	0,887	positiv	gleich
SH6.4	0,09	0,36	0,25	0,66	2,65	0,41	0,27	0,09	1	negativ	1		0,243	negativ	gleich
SH6.5	0,09	1,04	0,21	1,11	6,09	0,74	0,86	0,19	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,772	positiv	gleich
SH6.6	0,07	0,10	0,14	0,40	0,41	0,46	0,45	0,37	0	negativ	0		0,237	negativ	gleich
SH6.7	0,04	2,35	0,18	2,40	1,39	0,84	0,34	0,10	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,721	positiv	gleich
SH6.8	0,06	0,31	0,38	0,96	0,93	1,15	0,69	0,62	1	negativ	0		0,354	positiv	abweichend
SH6.9	0,13	0,26	0,72	2,08	1,82	0,68	0,48	0,16	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,546	positiv	gleich
SH6.10	0,05	0,29	0,06	0,73	0,38	0,43	0,25	0,10	0	negativ	0		0,436	positiv	abweichend
SH6.11	0,05	1,31	0,47	1,57	2,89	0,62	0,46	0,12	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,562	positiv	gleich
SH6.12	0,04	0,45	0,11	1,00	0,97	0,48	0,26	0,16	3	positiv	0		0,329	positiv	gleich
SH6.13	0,04	0,29	0,11	0,27	0,96	0,42	0,52	0,09	0	negativ	0		0,169	negativ	gleich
SH6.14	0,02	0,27	0,04	1,16	0,23	0,31	0,33	0,05	3	positiv	0		0,462	positiv	gleich
SH6.15	0,05	1,08	0,51	3,85	3,67	0,64	0,72	0,30	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,022	positiv	gleich
SH6.16	0,05	0,44	0,19	1,98	1,85	0,61	0,29	0,39	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,540	positiv	gleich
SH6.17	0,03	0,16	0,05	0,63	0,17	0,13	0,11	0,06	0	negativ	0		0,143	negativ	gleich
SH6.18	0,07	0,24	0,14	0,09	4,57	0,28	0,16	0,14	1	negativ	1		-0,013	negativ	gleich
SH6.19	0,04	0,51	0,35	2,72	4,60	0,46	0,23	0,21	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,769	positiv	gleich
SH6.20	4,75	2,05	0,36	7,15	2,52	4,97	7,07	2,06	9	positiv	1	Y. enterocolitica	1,476	positiv	gleich
SH6.21	0,07	0,07	0,09	0,21	0,30	0,15	0,16	0,13	0	negativ	0		0,135	negativ	gleich

 positiv  fraglich  abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH6.22	1,69	0,83	0,12	7,59	1,34	5,41	2,73	0,24	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,502	positiv	gleich
SH6.23	0,05	0,49	0,15	2,61	2,95	0,45	0,45	0,09	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,634	positiv	gleich
SH6.24	0,03	0,14	0,10	0,13	0,17	0,11	0,11	0,14	0	negativ	0		0,016	negativ	gleich
SH6.25	0,05	0,18	0,12	0,09	0,26	0,24	0,17	0,11	0	negativ	0		0,059	negativ	gleich
SH6.26	0,09	0,04	0,05	0,08	0,10	0,09	0,08	0,06	0	negativ	0		0,003	negativ	gleich
SH6.27	0,58	0,05	0,27	0,09	0,28	0,17	0,21	0,53	0	negativ	0		0,080	negativ	gleich
SH6.28	0,06	0,29	0,13	2,49	1,02	1,06	0,34	0,14	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,703	positiv	gleich
SH6.29	0,06	0,36	0,31	1,55	2,89	1,08	0,58	0,15	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,513	positiv	gleich
SH6.30	0,06	1,20	0,19	3,78	3,27	1,19	0,81	0,41	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,076	positiv	gleich
SH6.31	0,11	0,20	0,08	4,07	0,42	0,46	0,66	0,13	3	positiv	0		1,050	positiv	gleich
SH6.32	0,09	0,47	0,10	1,84	0,70	0,56	0,24	0,12	3	positiv	0		0,586	positiv	gleich
SH6.33	0,04	0,40	0,94	4,87	5,59	1,25	0,34	0,16	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,996	positiv	gleich
SH6.34	0,04	0,82	0,15	1,52	1,13	0,41	0,40	0,18	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,403	positiv	gleich
SH6.35	0,07	0,53	0,21	2,09	0,24	0,60	0,34	0,33	3	positiv	0		0,597	positiv	gleich
SH6.36	0,12	1,26	0,13	2,16	0,30	1,73	1,57	0,91	6	positiv	0		0,769	positiv	gleich
SH6.37	0,08	0,08	0,10	1,68	0,38	0,52	0,18	0,08	3	positiv	0		0,381	positiv	gleich
SH6.38	0,21	2,01	1,02	5,78	6,02	11,56	2,13	1,16	9	positiv	0		0,929	positiv	gleich
SH6.39	0,13	1,86	1,11	5,04	9,08	1,79	0,76	0,23	7	positiv	0		0,731	positiv	gleich
SH6.40	0,31	1,19	0,79	4,41	7,06	0,54	0,68	0,36	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,586	positiv	gleich
SH6.41	0,45	0,34	0,38	3,11	5,25	1,07	0,69	0,08	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,551	positiv	gleich
SH6.42	0,06	0,41	0,23	4,49	1,41	1,92	0,42	0,09	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,599	positiv	gleich
	positiv		fraglich			abweichend									

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH6.43	0,14	0,70	0,08	3,09	0,94	1,42	0,25	0,60	4	positiv	0		0,422	positiv	gleich
SH6.44	0,35	0,76	0,14	3,71	3,02	1,03	0,33	0,21	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,457	positiv	gleich
SH6.45	0,29	0,08	0,73	2,06	4,13	1,35	0,98	0,25	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,567	positiv	gleich
SH6.46	0,06	0,21	0,16	0,60	0,54	0,21	0,22	0,09	0	negativ	0		0,149	negativ	gleich
SH6.47	0,28	1,19	0,18	4,62	1,80	4,04	1,87	0,31	7	positiv	1	Y. enterocolitica	0,647	positiv	gleich
SH6.48	0,05	0,19	0,15	2,20	4,62	0,59	0,26	0,29	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,456	positiv	gleich
SH6.49	0,10	0,17	0,22	2,24	1,01	0,43	0,37	0,12	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,437	positiv	gleich
SH6.50	0,24	1,60	0,22	5,12	4,11	0,75	0,61	0,23	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,108	positiv	gleich
SH6.51	0,66	0,40	0,30	1,54	3,21	0,67	0,48	0,23	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,485	positiv	gleich
SH6.52	0,09	0,64	0,32	2,36	2,47	0,70	0,75	0,79	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,578	positiv	gleich
SH6.53	0,05	0,07	0,14	0,60	0,18	0,10	0,14	1,02	1	negativ	0		0,104	negativ	gleich
SH6.54	0,21	0,26	0,14	3,05	0,57	0,76	0,99	0,45	3	positiv	0		0,758	positiv	gleich
SH6.55	0,07	0,50	0,31	2,24	2,44	0,97	0,26	0,20	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,563	positiv	gleich
SH6.56	0,13	1,37	0,17	8,92	1,34	3,65	3,48	5,48	8	positiv	1	Y. enterocolitica	1,655	positiv	gleich
SH6.57	0,13	0,56	0,23	4,43	0,55	1,57	0,86	0,22	4	positiv	0		1,125	positiv	gleich
SH6.58	0,06	0,07	0,12	0,09	0,36	0,16	0,20	0,11	0	negativ	0		0,021	negativ	gleich
SH6.59	0,08	0,19	0,14	0,07	0,31	0,24	0,19	0,20	0	negativ	0		0,099	negativ	gleich
SH6.60	0,28	0,57	0,07	0,07	0,21	0,12	0,12	0,09	0	negativ	0		0,045	negativ	gleich
SH6.61	0,13	0,05	0,16	0,13	0,47	0,30	0,24	0,17	0	negativ	0		0,024	negativ	gleich
SH6.62	0,10	1,70	0,22	5,42	0,83	3,89	1,10	0,31	6	positiv	0		0,770	positiv	gleich
SH6.63	0,23	0,10	0,13	0,14	0,44	0,21	0,23	0,14	0	negativ	0		0,021	negativ	gleich
<div><div></div> positiv<div></div> fraglich<div></div> abweichend</div>															

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH6.64	0,08	0,10	0,14	0,13	0,29	0,22	0,22	0,14	0	negativ	0		0,055	negativ	gleich
SH6.65	0,06	0,45	0,59	1,25	3,20	0,96	0,50	0,19	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,506	positiv	gleich
SH6.66	0,17	0,89	1,02	3,88	4,85	0,78	1,30	0,21	6	positiv	0		0,875	positiv	gleich
SH6.67	0,04	0,13	0,06	0,13	0,21	0,24	0,16	0,09	0	negativ	0		-0,020	negativ	gleich
SH6.68	0,09	0,46	0,44	4,47	5,28	0,95	0,48	0,21	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,163	positiv	gleich
SH6.69	0,06	0,40	0,22	1,78	7,49	1,14	0,24	0,23	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,587	positiv	gleich
SH6.70	0,03	0,05	0,16	0,10	0,17	0,20	0,17	0,10	0	negativ	0		-0,025	negativ	gleich
SH6.71	0,03	0,42	0,39	1,51	3,05	0,24	0,54	0,31	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,368	positiv	gleich
SH6.72	0,16	1,81	0,10	10,45	1,34	2,03	1,65	0,12	7	positiv	1	Y. enterocolitica	1,838	positiv	gleich
SH6.73	0,93	0,90	0,29	7,64	2,40	5,55	0,44	0,62	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,810	positiv	gleich
SH6.74	1,99	1,57	0,25	7,44	1,27	4,89	2,79	1,99	9	positiv	1	Y. enterocolitica	0,976	positiv	gleich
SH6.75	0,21	0,78	0,14	2,39	1,60	1,63	0,41	0,15	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,513	positiv	gleich
SH6.76	0,83	1,84	0,27	5,96	2,42	4,49	1,11	0,76	7	positiv	1	Y. enterocolitica	0,854	positiv	gleich
SH6.77	0,17	0,60	0,17	3,05	0,92	1,39	0,45	0,15	4	positiv	0		0,376	positiv	gleich
SH6.78	0,30	1,10	0,17	2,27	0,49	0,66	0,54	0,28	4	positiv	0		0,398	positiv	gleich
SH6.79	1,10	1,19	0,08	4,87	2,26	0,75	2,03	0,26	7	positiv	1	Y. enterocolitica	0,805	positiv	gleich
SH6.80	0,15	0,30	0,27	7,03	0,70	1,70	0,43	0,09	4	positiv	0		0,810	positiv	gleich
SH6.81	0,56	3,20	0,16	5,53	3,92	3,11	1,38	0,59	7	positiv	1	Y. enterocolitica	0,799	positiv	gleich
SH6.82	0,35	1,02	0,09	4,39	1,15	2,03	0,59	0,26	6	positiv	1	Y. enterocolitica	0,667	positiv	gleich
SH6.83	0,28	0,07	0,07	0,20	0,27	0,21	0,16	0,07	0	negativ	0		0,021	negativ	gleich
SH6.84	0,28	1,02	0,13	3,62	0,86	1,08	1,83	0,18	6	positiv	0		0,574	positiv	gleich
	positiv		fraglich			abweichend									

 positiv

 fraglich

 abweichend

SERUM

Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH6.85	2,27	1,33	0,12	4,25	0,66	8,47	1,47	1,33	8	positiv	0		0,692	positiv	gleich
SH6.86	0,09	0,07	0,13	0,13	0,40	0,33	0,19	0,20	0	negativ	0		0,030	negativ	gleich
SH6.87	0,57	0,08	0,20	2,39	0,51	0,62	0,21	0,27	3	positiv	0		0,717	positiv	gleich
SH6.88	0,09	0,09	0,19	0,14	0,47	0,28	0,29	0,19	0	negativ	0		0,035	negativ	gleich
SH6.89	0,04	0,05	0,04	0,07	0,12	0,11	0,14	0,06	0	negativ	0		0,018	negativ	gleich
SH6.90	0,03	0,03	0,07	0,08	0,13	0,14	0,11	0,06	0	negativ	0		0,021	negativ	gleich
SH6.91	0,05	0,14	0,10	0,05	0,19	0,17	0,13	0,09	0	negativ	0		0,080	negativ	gleich
SH6.92	0,06	0,05	0,14	0,09	0,24	0,20	0,15	0,11	0	negativ	0		0,020	negativ	gleich
SH6.93	0,05	0,06	0,13	0,30	0,23	0,19	0,46	0,08	0	negativ	0		0,025	negativ	gleich
SH6.94	0,11	0,04	0,15	0,12	0,51	0,32	0,27	0,15	0	negativ	0		0,034	negativ	gleich
SH6.95	0,16	0,02	0,09	0,08	0,25	0,16	0,15	0,09	0	negativ	0		-0,008	negativ	gleich
SH6.96	0,16	0,04	0,06	0,07	0,15	0,10	0,10	0,06	0	negativ	0		0,038	negativ	gleich
SH6.97	0,07	0,15	0,19	0,15	0,35	0,36	0,21	0,13	0	negativ	0		-0,018	negativ	gleich
SH6.98	0,43	1,81	0,08	3,27	0,25	2,76	0,48	0,12	5	positiv	0		0,735	positiv	gleich
SH6.99	0,09	0,07	0,29	0,12	0,37	0,28	0,22	0,20	0	negativ	0		-0,007	negativ	gleich
SH6.100	0,05	0,04	0,06	0,08	0,23	0,12	0,14	0,10	0	negativ	0		0,019	negativ	gleich
SH6.110	0,94	0,74	0,21	1,66	0,63	0,66	0,44	0,14	3	positiv	0		0,375	positiv	gleich
SH6.111	2,58	2,45	0,12	3,12	0,25	1,17	0,75	0,12	6	positiv	0		0,592	positiv	gleich
SH6.112	0,10	1,72	0,10	2,73	0,58	1,09	0,45	0,11	5	positiv	0		0,868	positiv	gleich
SH6.113	0,20	1,45	0,19	5,66	2,16	0,78	0,37	0,20	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,857	positiv	gleich
SH6.114	0,12	1,96	0,13	11,34	1,13	7,73	0,58	0,95	6	positiv	1	Y. enterocolitica	1,625	positiv	gleich

 positiv fraglich abweichend

SERUM															
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1	ELISA						
CutOff	35	50	12,5	30	3,9	15	9	19							
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH6.115	0,15	1,14	0,15	5,15	0,36	2,48	1,49	0,41	6	positiv	0		0,989	positiv	gleich
SH6.116	0,53	0,39	0,11	3,34	0,43	0,41	0,49	0,16	3	positiv	0		0,553	positiv	gleich
SH6.123	0,05	0,07	0,10	1,59	0,16	0,31	0,11	0,08	3	positiv	0		0,538	positiv	gleich
SH6.126	0,04	0,10	0,09	0,53	0,21	0,20	0,14	0,07	0	negativ	0		0,409	positiv	abweichend
SH6.130	0,09	2,34	0,57	2,84	3,19	1,11	1,89	1,16	8	positiv	1	Y. enterocolitica	1,022	positiv	gleich
SH6.131	0,05	0,83	0,08	3,35	0,79	2,27	1,04	1,58	6	positiv	0		0,887	positiv	gleich
SH6.132	0,04	0,18	0,06	2,69	0,17	0,47	0,21	0,14	3	positiv	0		0,710	positiv	gleich
SH6.143	0,80	1,93	0,22	4,95	0,64	1,56	0,54	0,22	5	positiv	0		1,264	positiv	gleich
SH6.144	0,22	0,25	0,20	2,67	3,26	1,51	0,84	0,69	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,907	positiv	gleich
SH6.145	0,08	0,03	0,10	1,03	0,65	0,26	0,18	0,25	3	positiv	0		0,164	negativ	abweichend
SH6.146	0,06	0,17	0,19	0,75	3,68	0,47	0,30	0,39	1	negativ	1		0,265	negativ	gleich
SH6.147	0,05	0,22	0,15	1,67	2,04	0,53	0,57	0,19	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,706	positiv	gleich
SH6.148	0,06	0,82	0,36	3,97	6,02	0,64	0,22	0,19	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,989	positiv	gleich
SH6.149	0,05	0,62	0,26	2,43	2,43	0,48	0,35	0,18	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,594	positiv	gleich
SH6.150	0,04	0,37	0,23	0,96	0,56	0,18	0,28	0,10	0	negativ	0		0,200	negativ	gleich
COI < 0,67	563	366	521	267	346	321	395	504		negativ		Y. enterocolitica	Anzahl	negativ	gleich
										273	0	179	551	252	542
0,67 <= COI < 1	8	46	28	7	20	46	56	29		fraglich		Y. pseudotuberculosis		positiv	abweichend
										1		1	299		9
COI >= 1	10	169	32	307	215	214	130	48		positiv		Differenzierung in Prozent			prozentuale Abweichung
										307		58,63%			1,63%

 positiv
 fraglich
 abweichend

2 AUSWERTUNG FLEISCHTROPFSAFT IM BEADASSAY/ELISA

FTS															
Punkte		1	1	1	3	1	1	1	1						
CutOff		40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH1.1	0,16	0,02	0,04	0,59	0,18	0,14	0,12	0,15	0	negativ	0		0,017	negativ	gleich
SH1.2	0,30	0,03	0,05	0,62	0,23	0,24	0,24	0,25	0	negativ	0		0,031	negativ	gleich
SH1.4	0,09	0,04	0,04	0,17	0,19	0,06	0,06	0,06	0	negativ	0		-0,009	negativ	gleich
SH1.6	0,13	0,01	0,03	0,35	0,14	0,10	0,12	0,12	0	negativ	0		-0,019	negativ	gleich
SH1.7	0,09	0,05	0,04	0,18	0,20	0,07	0,05	0,07	0	negativ	0		0,003	negativ	gleich
SH1.8	0,24	0,02	0,03	0,34	0,20	0,19	0,15	0,20	0	negativ	0		-0,013	negativ	gleich
SH1.9	0,06	0,02	0,04	0,30	0,24	0,04	0,04	0,04	0	negativ	0		-0,012	negativ	gleich
SH1.10	0,25	0,08	0,04	0,58	0,21	0,20	0,18	0,20	0	negativ	0		-0,026	negativ	gleich
SH1.11	0,17	0,02	0,04	0,37	0,16	0,13	0,14	0,16	0	negativ	0		0,013	negativ	gleich
SH1.12	0,29	0,02	0,05	0,51	0,20	0,20	0,19	0,24	0	negativ	0		-0,024	negativ	gleich
SH1.13	0,20	0,02	0,03	0,48	0,18	0,18	0,16	0,18	0	negativ	0		-0,027	negativ	gleich
SH1.14	0,15	0,01	0,04	0,40	0,19	0,12	0,11	0,14	0	negativ	0		0,005	negativ	gleich
SH1.15	0,16	0,01	0,04	0,34	0,15	0,12	0,13	0,15	0	negativ	0		-0,023	negativ	gleich

positiv

fraglich

abweichend

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS															
	Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1						
	CutOff	40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOPE	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH1.16	0,16	0,01	0,03	0,31	0,15	0,12	0,11	0,12	0	negativ	0		-0,016	negativ	gleich
SH1.17	0,16	0,01	0,04	0,32	0,21	0,13	0,14	0,15	0	negativ	0		-0,031	negativ	gleich
SH1.18	0,19	0,02	0,03	0,41	0,19	0,15	0,15	0,16	0	negativ	0		-0,028	negativ	gleich
SH1.19	0,21	0,02	0,04	0,49	0,21	0,16	0,16	0,18	0	negativ	0		-0,023	negativ	gleich
SH1.20	0,19	0,01	0,03	0,37	0,15	0,14	0,13	0,16	0	negativ	0		-0,033	negativ	gleich
SH1.21	0,16	0,02	0,03	0,32	0,13	0,12	0,11	0,14	0	negativ	0		-0,013	negativ	gleich
SH1.22	0,19	0,02	0,03	0,43	0,21	0,15	0,13	0,16	0	negativ	0		-0,009	negativ	gleich
SH1.23	0,26	0,01	0,04	0,50	0,18	0,19	0,18	0,24	0	negativ	0		-0,012	negativ	gleich
SH1.24	0,31	0,03	0,04	0,58	0,20	0,21	0,20	0,23	0	negativ	0		-0,026	negativ	gleich
SH1.25	0,26	0,02	0,04	0,58	0,22	0,20	0,20	0,24	0	negativ	0		-0,017	negativ	gleich
SH1.26	0,26	0,02	0,04	0,47	0,20	0,21	0,19	0,25	0	negativ	0		-0,024	negativ	gleich
SH1.27	0,25	0,01	0,04	0,50	0,18	0,20	0,18	0,20	0	negativ	0		0,010	negativ	gleich
SH1.28	0,25	0,01	0,05	0,60	0,18	0,20	0,17	0,24	0	negativ	0		-0,020	negativ	gleich
SH1.29	0,22	0,01	0,04	0,42	0,21	0,18	0,17	0,22	0	negativ	0		-0,033	negativ	gleich
SH1.30	0,18	0,02	0,04	0,41	0,19	0,15	0,15	0,18	0	negativ	0		-0,023	negativ	gleich
SH1.31	0,35	0,02	0,06	0,71	0,21	0,27	0,25	0,29	0	negativ	0		-0,028	negativ	gleich
SH1.32	0,26	0,02	0,04	0,50	0,16	0,20	0,20	0,20	0	negativ	0		0,027	negativ	gleich
SH1.33	0,34	0,02	0,06	0,58	0,23	0,23	0,25	0,27	0	negativ	0		0,021	negativ	gleich
SH1.34	0,23	0,03	0,03	0,57	0,18	0,19	0,21	0,22	0	negativ	0		0,008	negativ	gleich
SH1.35	0,34	0,01	0,05	0,66	0,19	0,26	0,23	0,30	0	negativ	0		-0,027	negativ	gleich
SH1.36	0,44	0,02	0,04	0,54	0,17	0,31	0,25	0,33	0	negativ	0		-0,012	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS														
Punkte		1	1	1	3	1	1	1	1					
CutOff		40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40					
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung Vergleich
SH1.37	0,41	0,03	0,04	0,59	0,23	0,28	0,25	0,31	0	negativ	0		0,003	negativ gleich
SH1.38	0,31	0,08	0,06	0,55	0,24	0,22	0,22	0,27	0	negativ	0		-0,027	negativ gleich
SH1.39	0,29	0,02	0,05	0,53	0,17	0,22	0,19	0,27	0	negativ	0		-0,012	negativ gleich
SH1.40	0,34	0,05	0,06	0,59	0,22	0,25	0,22	0,29	0	negativ	0		-0,027	negativ gleich
SH1.41	0,21	0,04	0,03	0,27	0,14	0,15	0,12	0,12	0	negativ	0		-0,010	negativ gleich
SH1.43	0,30	0,02	0,04	0,67	0,17	0,26	0,22	0,25	0	negativ	0		-0,028	negativ gleich
SH1.44	0,42	0,02	0,04	0,52	0,21	0,25	0,28	0,29	0	negativ	0		-0,010	negativ gleich
SH1.45	0,60	0,02	0,06	0,69	0,25	0,39	0,39	0,45	0	negativ	0		-0,028	negativ gleich
SH1.46	0,26	0,02	0,04	0,52	0,17	0,20	0,20	0,24	0	negativ	0		0,016	negativ gleich
SH1.47	0,21	0,01	0,03	0,43	0,19	0,17	0,16	0,19	0	negativ	0		-0,012	negativ gleich
SH1.48	0,24	0,03	0,04	0,49	0,19	0,18	0,17	0,22	0	negativ	0		-0,017	negativ gleich
SH1.49	0,23	0,04	0,04	0,51	0,14	0,20	0,20	0,21	0	negativ	0		-0,024	negativ gleich
SH4.1	0,56	0,39	0,03	3,29	0,33	0,65	0,30	0,30	3	positiv	0		1,244	positiv gleich
SH4.2	0,64	0,44	0,17	2,36	5,88	0,44	0,34	0,47	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,684	positiv gleich
SH4.3	0,47	0,17	0,10	3,27	2,17	0,34	0,30	0,35	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,834	positiv gleich
SH4.4	0,62	1,15	0,38	8,58	7,66	0,55	0,37	0,43	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,579	positiv gleich
SH4.5	0,64	0,73	0,09	3,32	1,07	0,52	0,41	0,54	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,982	positiv gleich
SH4.6	0,29	0,34	0,10	3,93	1,52	0,21	0,17	0,18	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,922	positiv gleich
SH4.7	0,33	0,59	0,07	2,58	0,63	0,32	0,23	0,28	3	positiv	0		0,665	positiv gleich
SH4.8	0,59	1,53	0,07	5,96	0,61	0,48	0,38	0,51	4	positiv	0		0,985	positiv gleich
SH4.9	0,51	1,78	0,21	10,47	3,76	0,47	0,36	0,43	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,414	positiv gleich

positiv
fraglich
abweichend

FTS															
Punkte		1	1	1	3	1	1	1	1						
CutOff		40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH4.10	0,13	1,13	0,06	2,99	0,81	0,14	0,09	0,08	4	positiv	0		0,892	positiv	gleich
SH4.11	0,43	0,16	0,09	3,43	1,07	0,40	0,23	0,29	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,096	positiv	gleich
SH4.12	0,50	1,23	0,09	3,12	2,85	0,45	0,40	0,44	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,036	positiv	gleich
SH4.13	0,47	0,20	0,13	1,47	3,08	0,32	0,30	0,35	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,501	positiv	gleich
SH4.14	0,29	0,42	0,07	2,75	0,63	0,22	0,14	0,21	3	positiv	0		0,918	positiv	gleich
SH4.15	0,44	0,60	0,09	2,25	0,83	0,40	0,33	0,40	3	positiv	0		0,742	positiv	gleich
SH4.16	0,39	1,91	0,22	3,22	5,32	0,41	0,24	0,27	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,047	positiv	gleich
SH4.17	0,65	0,49	0,09	3,89	0,72	0,63	0,38	0,49	3	positiv	0		0,903	positiv	gleich
SH4.19	0,29	0,24	0,09	4,56	1,58	0,19	0,17	0,17	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,866	positiv	gleich
SH4.21	0,26	0,75	0,22	2,56	1,50	0,21	0,20	0,22	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,872	positiv	gleich
SH4.22	0,61	0,58	0,20	7,57	4,10	0,66	0,44	0,46	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,147	positiv	gleich
SH4.23	0,37	0,19	0,08	4,69	1,98	0,29	0,23	0,24	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,190	positiv	gleich
SH4.24	0,22	0,25	0,13	1,76	1,64	0,22	0,16	0,20	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,730	positiv	gleich
SH4.25	0,51	0,47	0,31	3,95	3,18	0,36	0,29	0,45	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,046	positiv	gleich
SH4.26	0,40	2,00	0,19	3,07	3,48	0,36	0,30	0,35	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,143	positiv	gleich
SH4.27	0,42	0,13	0,07	1,05	0,47	0,33	0,27	0,34	3	positiv	0		0,209	negativ	abweichend
SH4.28	0,40	0,65	0,20	6,09	2,05	0,65	0,27	0,32	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,452	positiv	gleich
SH4.29	0,60	0,42	0,07	4,42	0,36	0,54	0,32	0,41	3	positiv	0		1,220	positiv	gleich
SH4.30	0,33	0,48	0,08	2,03	1,21	0,29	0,22	0,25	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,635	positiv	gleich
SH4.31	0,42	0,12	0,15	2,54	1,32	0,41	0,31	0,34	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,728	positiv	gleich
SH4.32	0,43	0,18	0,35	8,43	4,47	0,50	0,23	0,32	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,389	positiv	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS															
	Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1						
	CutOff	40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH4.33	0,12	0,27	0,11	2,07	2,36	0,41	0,10	0,08	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,236	positiv	gleich
SH4.34	0,47	1,58	0,06	2,19	0,44	0,39	0,34	0,40	4	positiv	0		0,692	positiv	gleich
SH4.35	0,38	0,31	0,14	7,03	3,26	0,30	0,27	0,32	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,380	positiv	gleich
SH4.36	0,84	0,20	0,11	5,43	4,43	0,58	0,51	0,63	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,976	positiv	gleich
SH4.37	0,50	0,25	0,12	3,79	1,01	0,57	0,30	0,52	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,010	positiv	gleich
SH4.38	0,29	0,36	0,06	6,43	0,74	0,29	0,22	0,27	3	positiv	0		1,258	positiv	gleich
SH4.39	0,40	0,06	0,05	0,78	0,36	0,28	0,27	0,33	0	negativ	0		0,094	negativ	gleich
SH4.40	0,27	0,16	0,06	7,38	0,45	0,27	0,14	0,19	3	positiv	0		1,399	positiv	gleich
SH4.41	0,35	0,87	0,10	5,07	0,65	0,33	0,22	0,29	3	positiv	0		1,151	positiv	gleich
SH4.43	0,25	0,36	0,06	11,06	0,65	0,28	0,17	0,18	3	positiv	0		1,733	positiv	gleich
SH4.44	0,32	0,48	0,04	5,67	0,34	0,24	0,22	0,26	3	positiv	0		0,683	positiv	gleich
SH4.45	0,37	0,32	0,06	11,27	0,33	0,42	0,27	0,31	3	positiv	0		1,570	positiv	gleich
SH4.46	0,35	0,12	0,07	2,12	0,38	0,27	0,25	0,29	3	positiv	0		0,716	positiv	gleich
SH4.47	0,23	0,36	0,05	6,23	0,30	0,23	0,21	0,20	3	positiv	0		1,265	positiv	gleich
SH4.48	0,26	0,31	0,04	8,78	1,11	0,24	0,16	0,19	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,462	positiv	gleich
SH4.49	0,18	0,05	0,04	0,57	0,23	0,12	0,12	0,16	0	negativ	0		0,070	negativ	gleich
SH4.50	0,36	0,02	0,07	0,71	0,25	0,25	0,19	0,32	0	negativ	0		0,077	negativ	gleich
SH4.51	0,31	0,03	0,07	0,72	0,32	0,25	0,21	0,30	0	negativ	0		0,029	negativ	gleich
SH4.52	0,35	0,05	0,07	0,83	0,38	0,26	0,22	0,36	0	negativ	0		0,029	negativ	gleich
SH4.53	0,26	0,09	0,10	0,67	0,47	0,21	0,19	0,28	0	negativ	0		0,018	negativ	gleich
SH4.54	0,20	0,04	0,05	0,36	0,24	0,15	0,14	0,20	0	negativ	0		-0,012	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS														
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1						
CutOff	40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung Vergleich
SH4.55	0,32	0,02	0,07	0,69	0,31	0,25	0,21	0,31	0	negativ	0		0,005	negativ gleich
SH4.57	0,25	0,03	0,05	0,49	0,28	0,17	0,15	0,22	0	negativ	0		-0,011	negativ gleich
SH4.58	0,25	0,03	0,06	0,45	0,30	0,18	0,18	0,22	0	negativ	0		0,014	negativ gleich
SH4.59	0,34	0,05	0,06	0,66	0,32	0,23	0,21	0,30	0	negativ	0		-0,008	negativ gleich
SH4.60	0,37	0,08	0,08	0,64	0,38	0,25	0,22	0,35	0	negativ	0		0,012	negativ gleich
SH4.61	0,35	0,08	0,21	3,17	2,94	0,24	0,19	0,25	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,124	positiv gleich
SH4.62	0,21	0,64	0,08	3,61	1,59	0,17	0,15	0,21	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,138	positiv gleich
SH4.63	0,25	0,74	0,05	12,31	0,44	0,26	0,16	0,29	3	positiv	0		1,686	positiv gleich
SH4.64	0,27	0,43	0,36	4,74	3,46	0,24	0,12	0,17	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,215	positiv gleich
SH4.65	0,30	0,19	0,07	5,27	1,79	0,26	0,20	0,33	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,363	positiv gleich
SH4.67	0,33	0,62	0,14	2,80	2,35	0,24	0,22	0,29	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,047	positiv gleich
SH4.68	0,34	0,26	0,10	2,01	1,90	0,26	0,24	0,35	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,800	positiv gleich
SH4.69	0,18	0,17	0,14	2,54	1,93	0,19	0,10	0,12	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,152	positiv gleich
SH4.70	0,20	1,34	0,53	5,46	7,90	0,16	0,18	0,14	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,432	positiv gleich
SH4.71	0,25	0,80	0,17	4,16	4,25	0,20	0,20	0,25	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,289	positiv gleich
SH4.72	0,43	0,31	0,26	6,27	3,35	0,39	0,29	0,37	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,310	positiv gleich
SH4.73	0,63	0,80	0,61	5,52	8,30	0,46	0,38	0,51	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,550	positiv gleich
SH4.74	0,37	0,16	0,05	3,64	1,29	0,24	0,20	0,31	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,132	positiv gleich
SH4.75	0,43	0,77	0,09	5,00	1,86	0,37	0,26	0,35	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,389	positiv gleich
SH4.76	0,38	0,20	0,16	3,90	1,96	0,28	0,22	0,35	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,121	positiv gleich
SH4.77	0,36	0,14	1,63	3,51	8,25	0,26	0,22	0,30	5	positiv	0		1,017	positiv gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS														
Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1						
CutOff	40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung Vergleich
SH4.78	0,36	0,06	0,09	0,74	0,69	0,28	0,21	0,29	0	negativ	0		0,174	negativ gleich
SH4.79	0,40	0,03	0,07	0,61	0,37	0,28	0,23	0,33	0	negativ	0		0,045	negativ gleich
SH4.80	0,25	0,06	0,08	0,46	0,32	0,17	0,14	0,21	0	negativ	0		0,062	negativ gleich
SH4.81	0,37	0,03	0,05	0,59	0,30	0,25	0,20	0,30	0	negativ	0		0,032	negativ gleich
SH4.82	0,22	0,04	0,04	0,36	0,22	0,17	0,11	0,18	0	negativ	0		0,010	negativ gleich
SH4.83	0,42	0,08	0,05	0,63	0,24	0,27	0,23	0,33	0	negativ	0		0,027	negativ gleich
SH4.84	0,13	0,07	0,03	0,20	0,21	0,12	0,07	0,08	0	negativ	0		0,004	negativ gleich
SH4.85	0,31	0,13	0,09	0,40	0,28	0,20	0,15	0,22	0	negativ	0		-0,012	negativ gleich
SH4.86	0,14	0,04	0,03	0,21	0,21	0,10	0,09	0,11	0	negativ	0		-0,018	negativ gleich
SH4.87	0,25	0,02	0,03	0,39	0,21	0,15	0,12	0,21	0	negativ	0		0,032	negativ gleich
SH4.88	0,27	0,02	0,04	0,51	0,21	0,17	0,18	0,26	0	negativ	0		-0,014	negativ gleich
SH4.89	0,30	0,03	0,04	0,57	0,28	0,19	0,17	0,26	0	negativ	0		-0,016	negativ gleich
SH4.90	0,48	0,12	0,06	0,63	0,27	0,33	0,23	0,40	0	negativ	0		-0,010	negativ gleich
SH4.91	0,32	0,03	0,05	0,52	0,23	0,21	0,19	0,27	0	negativ	0		-0,008	negativ gleich
SH4.92	0,31	0,05	0,04	0,27	0,23	0,18	0,14	0,20	0	negativ	0		-0,015	negativ gleich
SH4.93	0,46	0,04	0,06	0,54	0,24	0,30	0,20	0,30	0	negativ	0		-0,055	negativ gleich
SH4.94	0,33	0,02	0,04	0,31	0,16	0,17	0,14	0,19	0	negativ	0		0,004	negativ gleich
SH4.95	0,34	0,04	0,05	0,46	0,27	0,22	0,18	0,23	0	negativ	0		-0,007	negativ gleich
SH5.1	0,37	0,40	0,21	7,99	4,54	0,38	0,23	0,29	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,767	positiv gleich
SH5.2	0,50	1,12	0,29	6,59	4,63	0,29	0,13	0,35	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,694	positiv gleich
SH5.3	0,15	1,08	0,13	14,70	1,03	0,32	0,11	0,08	5	positiv	1	Y. enterocolitica	2,056	positiv gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS															
Punkte		1	1	1	3	1	1	1	1						
CutOff		40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH5.4	0,11	0,47	0,03	3,02	0,21	0,17	0,08	0,10	3	positiv	0		1,349	positiv	gleich
SH5.5	0,39	0,28	0,04	5,97	0,34	0,35	0,16	0,25	3	positiv	0		1,384	positiv	gleich
SH5.6	0,29	0,82	0,12	4,11	1,60	0,30	0,20	0,32	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,248	positiv	gleich
SH5.7	0,24	1,46	0,06	13,49	0,44	0,49	0,20	0,25	4	positiv	0		2,176	positiv	gleich
SH5.8	0,15	0,28	0,04	1,69	0,21	0,17	0,11	0,14	3	positiv	0		0,946	positiv	gleich
SH5.9	0,29	1,45	0,14	5,12	2,66	0,42	0,22	0,29	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,612	positiv	gleich
SH5.10	0,25	1,58	0,46	13,15	6,96	0,16	0,20	0,27	5	positiv	1	Y. enterocolitica	2,008	positiv	gleich
SH5.11	0,14	0,28	0,04	3,23	0,88	0,19	0,09	0,14	3	positiv	0		1,426	positiv	gleich
SH5.12	0,14	1,12	0,06	9,16	0,33	0,48	0,14	0,12	4	positiv	0		1,867	positiv	gleich
SH5.13	0,43	1,06	0,25	4,36	3,87	0,31	0,21	0,33	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,176	positiv	gleich
SH5.14	0,16	0,94	0,06	8,79	0,29	0,20	0,07	0,09	3	positiv	0		1,632	positiv	gleich
SH5.15	0,34	0,02	0,03	0,40	0,17	0,20	0,16	0,22	0	negativ	0		-0,023	negativ	gleich
SH5.16	0,14	0,11	0,06	0,26	0,18	0,08	0,07	0,10	0	negativ	0		0,004	negativ	gleich
SH5.17	0,25	0,02	0,03	0,39	0,17	0,17	0,13	0,19	0	negativ	0		-0,025	negativ	gleich
SH5.18	0,39	0,02	0,03	0,39	0,16	0,20	0,16	0,24	0	negativ	0		0,001	negativ	gleich
SH5.19	0,43	0,01	0,04	0,52	0,21	0,26	0,19	0,31	0	negativ	0		0,026	negativ	gleich
SH5.20	0,26	0,02	0,05	0,41	0,19	0,17	0,13	0,21	0	negativ	0		-0,007	negativ	gleich
SH5.21	0,19	0,02	0,04	0,25	0,15	0,10	0,08	0,12	0	negativ	0		0,045	negativ	gleich
SH5.22	0,17	0,02	0,04	0,20	0,17	0,11	0,08	0,12	0	negativ	0		-0,027	negativ	gleich
SH5.23	0,14	0,02	0,02	0,19	0,14	0,09	0,07	0,10	0	negativ	0		-0,007	negativ	gleich
SH5.24	0,09	0,06	0,03	0,11	0,16	0,05	0,03	0,05	0	negativ	0		0,008	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS															
Punkte		1	1	1	3	1	1	1	1						
CutOff		40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOPE	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH5.25	0,16	0,02	0,03	0,24	0,16	0,10	0,08	0,10	0	negativ	0		0,003	negativ	gleich
SH5.26	0,16	0,02	0,03	0,24	0,13	0,10	0,08	0,12	0	negativ	0		-0,003	negativ	gleich
SH5.27	0,13	0,02	0,03	0,16	0,15	0,07	0,06	0,09	0	negativ	0		-0,015	negativ	gleich
SH5.28	0,39	0,05	0,03	0,53	0,20	0,23	0,17	0,28	0	negativ	0		-0,022	negativ	gleich
SH5.29	0,14	0,03	0,03	0,19	0,17	0,08	0,06	0,09	0	negativ	0		-0,010	negativ	gleich
SH5.30	0,10	0,01	0,03	0,14	0,15	0,07	0,04	0,08	0	negativ	0		-0,001	negativ	gleich
SH5.31	0,37	0,01	0,04	0,54	0,19	0,26	0,16	0,31	0	negativ	0		0,025	negativ	gleich
SH5.32	0,21	0,06	0,03	0,32	0,21	0,13	0,10	0,17	0	negativ	0		-0,023	negativ	gleich
SH5.33	0,09	0,02	0,03	0,10	0,14	0,04	0,04	0,05	0	negativ	0		-0,012	negativ	gleich
SH5.34	0,14	0,01	0,03	0,17	0,16	0,09	0,07	0,10	0	negativ	0		-0,021	negativ	gleich
SH5.35	0,19	0,02	0,05	0,36	0,18	0,11	0,11	0,17	0	negativ	0		-0,027	negativ	gleich
SH5.36	0,17	0,11	0,03	0,13	0,19	0,08	0,05	0,06	0	negativ	0		-0,015	negativ	gleich
SH5.37	0,04	0,03	0,02	0,09	0,18	0,03	0,03	0,03	0	negativ	0		-0,014	negativ	gleich
SH5.38	0,23	0,02	0,03	0,27	0,17	0,14	0,11	0,17	0	negativ	0		-0,003	negativ	gleich
SH5.39	0,17	0,09	0,04	0,26	0,17	0,11	0,07	0,11	0	negativ	0		-0,011	negativ	gleich
SH5.40	0,22	0,03	0,04	0,32	0,20	0,12	0,09	0,17	0	negativ	0		-0,001	negativ	gleich
SH5.41	0,21	0,02	0,03	0,32	0,19	0,14	0,11	0,17	0	negativ	0		-0,019	negativ	gleich
SH5.42	0,05	0,02	0,04	0,09	0,12	0,03	0,03	0,03	0	negativ	0		0,016	negativ	gleich
SH5.43	0,09	0,03	0,03	0,15	0,15	0,06	0,05	0,07	0	negativ	0		0,021	negativ	gleich
SH5.44	0,20	0,02	0,03	0,23	0,19	0,12	0,10	0,13	0	negativ	0		0,023	negativ	gleich
SH5.45	0,10	0,02	0,04	0,20	0,18	0,07	0,06	0,08	0	negativ	0		-0,022	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS														
	Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1					
	CutOff	40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40					
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung Vergleich
SH5.46	0,31	0,03	0,05	0,47	0,21	0,20	0,14	0,24	0	negativ	0		0,104	negativ gleich
SH5.47	0,11	0,01	0,03	0,14	0,14	0,07	0,06	0,07	0	negativ	0		-0,029	negativ gleich
SH5.48	0,18	0,03	0,04	0,33	0,27	0,14	0,11	0,18	0	negativ	0		0,073	negativ gleich
SH5.49	0,08	0,04	0,03	1,03	0,12	0,09	0,04	0,04	3	positiv	0		0,441	positiv gleich
SH5.50	0,08	0,09	0,03	3,87	0,19	0,06	0,04	0,05	3	positiv	0		0,742	positiv gleich
SH5.51	0,13	0,11	0,02	1,02	0,15	0,10	0,07	0,10	3	positiv	0		0,385	positiv gleich
SH5.52	0,15	0,32	0,08	1,06	0,66	0,16	0,11	0,13	3	positiv	0		0,599	positiv gleich
SH5.53	0,09	0,40	0,03	4,67	0,20	0,07	0,05	0,05	3	positiv	0		1,065	positiv gleich
SH5.54	0,16	0,57	0,34	3,73	4,13	0,13	0,10	0,11	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,053	positiv gleich
SH5.55	0,18	0,18	0,04	1,73	0,27	0,14	0,10	0,15	3	positiv	0		0,541	positiv gleich
SH5.56	0,06	0,08	0,04	0,75	0,51	0,04	0,03	0,05	0	negativ	0		0,168	negativ gleich
SH5.57	0,08	0,03	0,11	0,94	1,68	0,06	0,04	0,05	1	negativ	1		0,277	negativ gleich
SH5.58	0,13	1,25	0,04	6,85	1,63	0,23	0,13	0,17	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,186	positiv gleich
SH5.59	0,17	0,33	0,05	1,65	1,18	0,10	0,08	0,10	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,519	positiv gleich
SH5.60	0,06	0,13	0,07	1,59	1,14	0,11	0,03	0,05	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,641	positiv gleich
SH5.61	0,07	0,02	0,02	0,14	0,13	0,05	0,03	0,04	0	negativ	0		-0,014	negativ gleich
SH5.62	0,12	0,02	0,03	0,23	0,15	0,08	0,06	0,10	0	negativ	0		-0,018	negativ gleich
SH5.63	0,08	0,06	0,03	0,17	0,12	0,06	0,04	0,06	0	negativ	0		-0,011	negativ gleich
SH5.64	0,08	0,03	0,02	0,12	0,14	0,05	0,04	0,13	0	negativ	0		-0,017	negativ gleich
SH5.65	0,13	0,03	0,03	0,19	0,20	0,08	0,05	0,07	0	negativ	0		-0,011	negativ gleich
SH5.66	0,10	0,05	0,02	0,14	0,13	0,06	0,05	0,06	0	negativ	0		-0,013	negativ gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS															
Punkte		1	1	1	3	1	1	1	1						
CutOff		40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOPE	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH5.67	0,12	0,02	0,02	0,18	0,13	0,07	0,06	0,08	0	negativ	0		-0,022	negativ	gleich
SH5.68	0,09	0,02	0,02	0,09	0,15	0,04	0,03	0,04	0	negativ	0		-0,001	negativ	gleich
SH5.69	0,07	0,03	0,03	0,07	0,08	0,04	0,03	0,03	0	negativ	0		-0,018	negativ	gleich
SH5.70	0,06	0,02	0,03	0,11	0,13	0,04	0,03	0,03	0	negativ	0		0,012	negativ	gleich
SH5.71	0,23	0,04	0,03	0,33	0,24	0,13	0,09	0,14	0	negativ	0		-0,008	negativ	gleich
SH5.72	0,17	0,05	0,03	0,28	0,18	0,12	0,08	0,12	0	negativ	0		-0,022	negativ	gleich
SH5.73	0,13	0,02	0,04	0,18	0,14	0,09	0,07	0,10	0	negativ	0		-0,013	negativ	gleich
SH5.74	0,11	0,04	0,07	0,17	0,20	0,09	0,05	0,06	0	negativ	0		-0,008	negativ	gleich
SH5.75	0,08	0,02	0,03	0,09	0,10	0,04	0,03	0,03	0	negativ	0		-0,024	negativ	gleich
SH5.76	0,06	0,02	0,02	0,12	0,16	0,03	0,03	0,03	0	negativ	0		-0,014	negativ	gleich
SH5.77	0,11	0,02	0,03	0,21	0,17	0,08	0,06	0,08	0	negativ	0		0,006	negativ	gleich
SH5.78	0,08	0,01	0,03	0,09	0,15	0,05	0,04	0,04	0	negativ	0		-0,001	negativ	gleich
SH5.79	0,07	0,01	0,02	0,09	0,12	0,03	0,03	0,03	0	negativ	0		-0,022	negativ	gleich
SH5.80	0,12	0,05	0,04	0,21	0,25	0,08	0,06	0,08	0	negativ	0		-0,019	negativ	gleich
SH5.81	0,11	0,03	0,02	0,13	0,13	0,06	0,05	0,07	0	negativ	0		0,013	negativ	gleich
SH5.82	0,08	0,04	0,02	0,11	0,11	0,05	0,04	0,05	0	negativ	0		-0,014	negativ	gleich
SH5.83	0,13	0,02	0,02	0,21	0,15	0,08	0,07	0,09	0	negativ	0		-0,013	negativ	gleich
SH5.84	0,13	0,12	0,03	0,16	0,16	0,08	0,06	0,08	0	negativ	0		-0,014	negativ	gleich
SH5.85	0,07	0,03	0,03	0,11	0,19	0,06	0,03	0,03	0	negativ	0		-0,008	negativ	gleich
SH5.86	0,11	0,03	0,02	0,15	0,16	0,06	0,05	0,07	0	negativ	0		-0,019	negativ	gleich
SH5.87	0,09	0,04	0,03	0,39	0,27	0,07	0,04	0,05	0	negativ	0		0,203	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS															
	Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1						
	CutOff	40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH5.88	0,09	0,30	0,11	1,21	1,57	0,10	0,07	0,05	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,639	positiv	gleich
SH5.89	0,08	0,10	0,05	1,35	0,71	0,07	0,05	0,06	3	positiv	0		0,500	positiv	gleich
SH5.90	0,07	0,15	0,07	2,74	2,18	0,06	0,04	0,04	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,647	positiv	gleich
SH5.91	0,17	0,13	0,04	1,31	1,04	0,11	0,10	0,13	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,372	positiv	gleich
SH5.92	0,25	0,20	1,48	3,82	7,47	0,17	0,13	0,20	5	positiv	0		0,971	positiv	gleich
SH5.93	0,09	0,09	0,31	1,06	2,16	0,05	0,05	0,05	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,500	positiv	gleich
SH5.95	0,15	0,06	0,06	1,02	0,58	0,11	0,09	0,12	3	positiv	0		0,305	positiv	gleich
SH5.96	0,09	0,09	0,04	1,00	0,54	0,08	0,05	0,07	3	positiv	0		0,377	positiv	gleich
SH5.97	0,11	0,19	0,07	2,04	1,62	0,07	0,06	0,09	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,830	positiv	gleich
SH5.98	0,11	0,29	0,06	1,67	0,96	0,11	0,06	0,07	3	positiv	0		0,714	positiv	gleich
SH5.99	0,08	0,45	0,03	0,58	0,35	0,10	0,07	0,06	0	negativ	0		0,398	positiv	abweichend
SH5.100	0,11	0,30	0,10	1,47	1,44	0,09	0,08	0,08	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,693	positiv	gleich
SH6.1	0,09	0,18	0,03	1,83	0,94	0,08	0,06	0,11	3	positiv	0		0,754	positiv	gleich
SH6.2	0,07	0,19	0,05	0,76	1,02	0,08	0,08	0,05	1	negativ	1		0,377	positiv	abweichend
SH6.3	0,11	1,01	0,13	1,50	3,35	0,08	0,09	0,10	5	positiv	1	Y. enterocolitica	0,667	positiv	gleich
SH6.4	0,09	0,21	0,10	0,58	1,99	0,07	0,04	0,04	1	negativ	1		0,334	positiv	abweichend
SH6.5	0,08	0,11	0,07	0,50	0,55	0,06	0,04	0,07	0	negativ	0		0,195	negativ	gleich
SH6.6	0,20	0,08	0,03	0,52	0,29	0,14	0,09	0,10	0	negativ	0		0,291	negativ	gleich
SH6.7	0,12	0,15	0,08	1,04	0,82	0,12	0,07	0,09	3	positiv	0		0,593	positiv	gleich
SH6.8	0,08	0,29	0,14	1,23	3,13	0,09	0,08	0,05	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,643	positiv	gleich
SH6.9	0,21	0,05	0,06	1,43	0,50	0,12	0,06	0,08	3	positiv	0		0,452	positiv	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS															
	Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1						
	CutOff	40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH6.10	0,14	0,14	0,06	1,48	0,76	0,10	0,08	0,14	3	positiv	0		0,392	positiv	gleich
SH6.11	0,06	0,16	0,13	1,82	1,12	0,06	0,04	0,05	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,624	positiv	gleich
SH6.12	0,06	0,17	0,03	0,62	0,20	0,05	0,05	0,04	0	negativ	0		0,252	negativ	gleich
SH6.13	0,09	0,08	0,03	0,44	0,28	0,07	0,08	0,09	0	negativ	0		0,353	positiv	abweichend
SH6.14	0,10	0,03	0,10	0,22	1,66	0,06	0,04	0,04	1	negativ	1		0,148	negativ	gleich
SH6.15	0,08	0,17	0,08	1,92	1,12	0,06	0,05	0,04	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,561	positiv	gleich
SH6.16	0,11	0,51	0,30	2,23	4,92	0,07	0,05	0,05	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,691	positiv	gleich
SH6.17	0,07	0,10	0,03	1,60	0,27	0,06	0,04	0,04	3	positiv	0		0,468	positiv	gleich
SH6.18	0,12	0,02	0,03	0,18	0,19	0,09	0,07	0,09	0	negativ	0		-0,004	negativ	gleich
SH6.19	0,12	0,02	0,02	0,14	0,13	0,07	0,05	0,22	0	negativ	0		-0,014	negativ	gleich
SH6.20	0,07	0,08	0,05	0,78	0,57	0,06	0,04	0,04	0	negativ	0		0,294	negativ	gleich
SH6.21	0,19	1,28	0,04	10,03	0,41	1,28	0,12	0,12	5	positiv	0		1,666	positiv	gleich
SH6.22	0,13	0,31	0,21	1,58	3,15	0,12	0,08	0,08	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,659	positiv	gleich
SH6.23	0,16	0,17	0,05	0,50	0,55	0,11	0,08	0,12	0	negativ	0		0,310	positiv	abweichend
SH6.24	0,21	0,12	0,03	0,63	0,24	0,14	0,11	0,16	0	negativ	0		0,196	negativ	gleich
SH6.25	0,14	0,07	0,03	0,21	0,21	0,08	0,05	0,06	0	negativ	0		0,113	negativ	gleich
SH6.26	0,19	0,03	0,03	0,85	0,15	0,10	0,08	0,11	0	negativ	0		0,164	negativ	gleich
SH6.27	0,08	0,03	0,03	0,12	0,23	0,04	0,03	0,03	0	negativ	0		0,032	negativ	gleich
SH6.28	0,08	0,09	0,05	1,49	1,35	0,06	0,04	0,04	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,789	positiv	gleich
SH6.29	0,18	0,79	0,08	6,16	4,48	0,14	0,14	0,15	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,211	positiv	gleich
SH6.30	0,23	0,21	0,05	2,01	1,28	0,16	0,10	0,17	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,711	positiv	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS															
Punkte		1	1	1	3	1	1	1	1						
CutOff		40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH6.31	0,14	0,09	0,09	1,34	1,01	0,14	0,08	0,10	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,602	positiv	gleich
SH6.32	0,10	0,08	0,10	0,48	0,59	0,09	0,06	0,05	0	negativ	0		0,297	negativ	gleich
SH6.33	0,14	0,13	0,04	0,60	0,64	0,09	0,07	0,11	0	negativ	0		0,164	negativ	gleich
SH6.34	0,13	0,09	0,17	1,51	2,46	0,10	0,08	0,10	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,496	positiv	gleich
SH6.35	0,14	0,12	0,13	0,54	0,62	0,11	0,09	0,13	0	negativ	0		0,755	positiv	abweichend
SH6.36	0,09	0,60	0,23	1,01	7,24	0,08	0,07	0,09	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,579	positiv	gleich
SH6.37	0,17	0,40	0,17	0,73	2,87	0,12	0,10	0,13	1	negativ	1		0,509	positiv	abweichend
SH6.38	0,13	0,20	0,08	1,87	1,50	0,13	0,06	0,10	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,574	positiv	gleich
SH6.39	0,15	0,21	0,08	2,14	1,35	0,12	0,08	0,12	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,665	positiv	gleich
SH6.40	0,20	0,21	0,04	3,26	2,44	0,21	0,12	0,15	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,101	positiv	gleich
SH6.41	0,15	0,06	0,04	1,06	0,24	0,12	0,09	0,13	3	positiv	0		0,412	positiv	gleich
SH6.42	0,06	0,20	0,08	1,88	1,44	0,05	0,03	0,03	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,827	positiv	gleich
SH6.43	0,18	0,13	0,04	1,02	0,23	0,13	0,09	0,12	3	positiv	0		0,502	positiv	gleich
SH6.44	0,07	0,11	0,09	1,30	0,44	0,06	0,04	0,03	3	positiv	0		0,641	positiv	gleich
SH6.45	0,16	0,38	0,06	1,84	0,83	0,10	0,08	0,09	3	positiv	0		0,651	positiv	gleich
SH6.46	0,17	0,04	0,03	2,26	0,26	0,09	0,07	0,09	3	positiv	0		0,828	positiv	gleich
SH6.47	0,15	0,16	0,05	2,56	0,82	0,15	0,05	0,08	3	positiv	0		0,870	positiv	gleich
SH6.48	0,21	0,09	0,20	2,58	2,27	0,17	0,11	0,12	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,782	positiv	gleich
SH6.49	0,21	0,07	0,04	1,82	0,38	0,18	0,12	0,17	3	positiv	0		0,489	positiv	gleich
SH6.50	0,07	0,25	0,06	0,58	0,67	0,05	0,04	0,04	0	negativ	0		0,339	positiv	abweichend
SH6.51	0,22	0,06	0,04	1,00	0,46	0,15	0,11	0,14	3	positiv	0		0,460	positiv	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS															
	Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1						
	CutOff	40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH6.52	0,14	0,39	0,04	3,37	0,40	0,18	0,08	0,09	3	positiv	0		1,093	positiv	gleich
SH6.54	0,09	0,02	0,08	0,19	0,14	0,06	0,04	0,06	0	negativ	0		0,096	negativ	gleich
SH6.55	0,14	0,18	0,25	1,84	4,02	0,18	0,07	0,09	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,616	positiv	gleich
SH6.56	0,13	0,32	0,11	2,26	1,79	0,11	0,07	0,08	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,698	positiv	gleich
SH6.57	0,12	0,02	0,02	0,13	0,19	0,06	0,04	0,04	0	negativ	0		0,019	negativ	gleich
SH6.58	0,11	0,04	0,02	0,15	0,12	0,07	0,05	0,07	0	negativ	0		-0,007	negativ	gleich
SH6.59	0,09	0,02	0,02	0,07	0,13	0,04	0,03	0,03	0	negativ	0		-0,008	negativ	gleich
SH6.60	0,07	0,02	0,02	0,09	0,10	0,03	0,02	0,02	0	negativ	0		-0,019	negativ	gleich
SH6.61	0,05	0,01	0,16	0,06	0,14	0,03	0,02	0,02	0	negativ	0		-0,003	negativ	gleich
SH6.62	0,10	0,06	0,02	0,14	0,14	0,07	0,05	0,07	0	negativ	0		-0,023	negativ	gleich
SH6.63	0,13	0,04	0,02	0,12	0,21	0,07	0,04	0,05	0	negativ	0		-0,002	negativ	gleich
SH6.64	0,09	0,02	0,02	0,12	0,13	0,05	0,04	0,05	0	negativ	0		0,013	negativ	gleich
SH6.65	0,11	0,01	0,03	0,14	0,14	0,07	0,05	0,07	0	negativ	0		-0,009	negativ	gleich
SH6.66	0,08	0,14	0,04	1,03	0,31	0,06	0,05	0,13	3	positiv	0		0,404	positiv	gleich
SH6.67	0,05	0,06	0,04	0,62	0,29	0,04	0,03	0,02	0	negativ	0		0,310	positiv	abweichend
SH6.68	0,17	0,02	0,02	0,28	0,17	0,10	0,08	0,12	0	negativ	0		0,034	negativ	gleich
SH6.69	0,07	0,11	0,06	1,84	0,58	0,07	0,04	0,05	3	positiv	0		0,696	positiv	gleich
SH6.70	0,06	0,08	0,09	2,94	1,54	0,13	0,05	0,06	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,876	positiv	gleich
SH6.71	0,12	0,01	0,03	0,40	0,22	0,08	0,07	0,09	0	negativ	0		0,161	negativ	gleich
SH6.72	0,06	0,08	0,03	1,70	0,98	0,04	0,03	0,08	3	positiv	0		0,544	positiv	gleich
SH6.73	0,09	0,03	0,02	0,36	0,19	0,04	0,03	0,04	0	negativ	0		0,115	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS															
Punkte		1	1	1	3	1	1	1	1						
CutOff		40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH6.74	0,13	0,39	0,03	1,90	0,50	0,09	0,05	0,05	3	positiv	0		0,570	positiv	gleich
SH6.75	0,14	0,03	0,03	2,55	0,23	0,11	0,07	0,09	3	positiv	0		0,601	positiv	gleich
SH6.76	0,12	0,07	0,04	0,67	0,39	0,08	0,05	0,06	0	negativ	0		0,287	negativ	gleich
SH6.77	0,17	0,03	0,03	0,59	0,19	0,12	0,09	0,12	0	negativ	0		0,180	negativ	gleich
SH6.78	0,07	0,03	0,03	3,90	0,17	0,04	0,03	0,02	3	positiv	0		0,937	positiv	gleich
SH6.79	0,14	0,07	0,05	4,56	1,21	0,14	0,07	0,09	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,306	positiv	gleich
SH6.80	0,13	0,22	0,03	3,12	0,30	0,14	0,08	0,09	3	positiv	0		0,874	positiv	gleich
SH6.82	0,62	1,86	0,15	11,08	3,80	0,78	0,11	0,23	5	positiv	1	Y. enterocolitica	1,423	positiv	gleich
SH6.83	0,20	0,29	0,05	1,67	1,57	0,14	0,09	0,11	4	positiv	1	Y. enterocolitica	0,528	positiv	gleich
SH6.84	0,06	0,03	0,04	2,22	0,51	0,05	0,03	0,02	3	positiv	0		0,823	positiv	gleich
SH6.85	0,14	0,22	0,04	6,53	1,03	0,17	0,07	0,10	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,192	positiv	gleich
SH6.87	0,10	0,23	0,04	3,50	0,71	0,13	0,05	0,09	3	positiv	0		0,955	positiv	gleich
SH6.88	0,07	0,02	0,02	0,08	0,18	0,04	0,03	0,03	0	negativ	0		0,002	negativ	gleich
SH6.89	0,14	0,90	0,05	2,48	0,70	0,23	0,11	0,09	3	positiv	0		0,886	positiv	gleich
SH6.90	0,12	0,02	0,02	0,14	0,15	0,08	0,05	0,07	0	negativ	0		-0,008	negativ	gleich
SH6.91	0,11	0,04	0,03	0,10	0,14	0,06	0,04	0,07	0	negativ	0		-0,016	negativ	gleich
SH6.92	0,13	0,02	0,03	0,16	0,14	0,08	0,06	0,07	0	negativ	0		-0,013	negativ	gleich
SH6.93	0,12	0,01	0,02	0,14	0,17	0,08	0,06	0,08	0	negativ	0		0,004	negativ	gleich
SH6.94	0,07	0,01	0,02	0,08	0,17	0,05	0,04	0,04	0	negativ	0		-0,022	negativ	gleich
SH6.95	0,11	0,03	0,03	0,10	0,11	0,05	0,04	0,04	0	negativ	0		-0,022	negativ	gleich
SH6.96	0,11	0,03	0,03	0,15	0,11	0,07	0,05	0,08	0	negativ	0		-0,021	negativ	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS															
Punkte		1	1	1	3	1	1	1	1						
CutOff		40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40						
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
SH6.97	0,33	0,54	0,06	4,24	1,58	0,36	0,13	0,14	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,180	positiv	gleich
SH6.98	0,14	0,02	0,02	0,22	0,21	0,10	0,08	0,11	0	negativ	0		0,009	negativ	gleich
SH6.99	0,14	0,04	0,02	0,17	0,16	0,09	0,06	0,08	0	negativ	0		0,003	negativ	gleich
SH6.100	0,05	0,02	0,03	0,09	0,16	0,05	0,02	0,02	0	negativ	0		-0,017	negativ	gleich
SH6.101	0,11	0,04	0,03	0,13	0,16	0,05	0,04	0,05	0	negativ	0		-0,016	negativ	gleich
SH6.102	0,08	0,02	0,03	0,09	0,12	0,05	0,04	0,05	0	negativ	0		-0,023	negativ	gleich
SH6.103	0,06	0,02	0,03	0,09	0,16	0,05	0,03	0,03	0	negativ	0		0,046	negativ	gleich
SH6.104	0,15	0,01	0,03	0,21	0,16	0,09	0,08	0,10	0	negativ	0		-0,027	negativ	gleich
SH6.105	0,11	0,22	0,03	2,81	0,28	0,09	0,06	0,07	3	positiv	0		0,713	positiv	gleich
SH6.106	0,10	0,01	0,02	0,11	0,14	0,07	0,05	0,07	0	negativ	0		-0,023	negativ	gleich
SH6.107	0,14	0,07	0,02	0,86	0,11	0,08	0,07	0,09	0	negativ	0		0,365	positiv	abweichend
SH6.108	0,08	0,18	0,04	1,29	0,73	0,05	0,03	0,03	3	positiv	0		0,410	positiv	gleich
SH6.110	0,12	0,26	0,03	2,39	0,34	0,13	0,06	0,05	3	positiv	0		0,781	positiv	gleich
SH6.111	0,20	0,19	0,03	1,22	0,18	0,07	0,05	0,12	3	positiv	0		0,305	positiv	gleich
SH6.112	0,14	0,15	0,05	0,62	0,28	0,10	0,08	0,09	0	negativ	0		0,282	negativ	gleich
SH6.113	0,15	0,29	0,05	5,06	1,90	0,18	0,07	0,13	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	1,106	positiv	gleich
SH6.114	0,09	0,13	0,02	2,03	0,39	0,06	0,03	0,04	3	positiv	0		0,664	positiv	gleich
SH6.115	0,17	0,21	0,04	3,62	0,48	0,16	0,07	0,09	3	positiv	0		0,753	positiv	gleich
SH6.116	0,13	0,07	0,05	2,56	1,16	0,07	0,05	0,06	4	positiv	1	<i>Y. enterocolitica</i>	0,667	positiv	gleich
SH6.117	0,12	0,14	0,03	1,27	0,27	0,11	0,05	0,06	3	positiv	0		0,489	positiv	gleich
SH6.118	0,12	0,10	0,03	2,28	0,56	0,16	0,06	0,08	3	positiv	0		0,711	positiv	gleich

 positiv

 fraglich

 abweichend

FTS														
Punkte		1	1	1	3	1	1	1	1					
CutOff		40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40					
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung		Diskriminierung	S/P	Auswertung Vergleich
SH6.119	0,12	0,21	0,07	0,35	0,63	0,11	0,05	0,05	0	negativ	0		1,064	positiv abweichend
SH6.120	0,15	0,93	0,04	6,82	0,34	0,20	0,09	0,07	3	positiv	0		1,260	positiv gleich
SH6.121	0,14	0,02	0,02	0,10	0,14	0,04	0,03	0,03	0	negativ	0		-0,004	negativ gleich
SH6.122	0,11	0,03	0,03	0,19	0,14	0,08	0,06	0,09	0	negativ	0		0,023	negativ gleich
SH6.123	0,14	0,65	0,03	1,33	0,19	0,14	0,08	0,10	3	positiv	0		0,833	positiv gleich
SH6.124	0,12	0,03	0,02	0,18	0,11	0,07	0,05	0,07	0	negativ	0		0,013	negativ gleich
SH6.125	0,08	0,01	0,02	0,20	0,14	0,06	0,04	0,05	0	negativ	0		0,049	negativ gleich
SH6.126	0,14	0,02	0,03	0,22	0,18	0,10	0,08	0,10	0	negativ	0		0,024	negativ gleich
SH6.127	0,14	0,47	0,05	5,33	2,94	0,45	0,15	0,24	4	positiv	1	Y. enterocolitica	1,048	positiv gleich
SH6.128	0,05	0,01	0,02	1,18	0,14	0,09	0,03	0,03	3	positiv	0		0,414	positiv gleich
SH6.129	0,12	0,15	0,04	1,31	0,32	0,07	0,06	0,08	3	positiv	0		0,539	positiv gleich
SH6.130	0,13	0,02	0,03	0,26	0,14	0,09	0,07	0,11	0	negativ	0		0,037	negativ gleich
SH6.131	0,10	0,11	0,02	4,05	0,15	0,08	0,06	0,07	3	positiv	0		1,140	positiv gleich
SH6.132	0,16	0,26	0,06	2,48	0,61	0,17	0,10	0,12	3	positiv	0		0,860	positiv gleich
SH6.133	0,13	0,01	0,03	0,24	0,14	0,08	0,06	0,09	0	negativ	0		0,009	negativ gleich
SH6.134	0,11	0,24	0,04	0,71	0,12	0,09	0,06	0,07	0	negativ	0		0,282	negativ gleich
SH6.135	0,08	0,06	0,02	1,31	0,13	0,06	0,04	0,05	3	positiv	0		0,217	negativ abweichend
SH6.136	0,19	0,02	0,03	0,32	0,14	0,13	0,10	0,14	0	negativ	0		-0,017	negativ gleich
SH6.138	0,16	0,01	0,03	1,06	0,19	0,13	0,09	0,14	3	positiv	0		0,426	positiv gleich

positiv
fraglich
abweichend

FTS														
	Punkte	1	1	1	3	1	1	1	1					
	CutOff	40	33	12,5	11,6	2,2	45	40	40					
Sample	03 YOP M	04 VAG A	05 Psa A	06 YOP D	07 Myf A	08 YOP E	09 YOP H	10 YOP N	Σ	Bewertung	Diskriminierung	S/P	Auswertung	Vergleich
COI < 0,67	367,00	336,00	366,00	186,00	258,00	366,00	368,00	368,00		negativ 204	<i>Y. enterocolitica</i> 85		negativ 195	gleich 355
0,67 <= COI < 1	1,00	12,00	0,00	18,00	18,00	1,00	0,00	0,00		fraglich 0	<i>Y. pseudotuberculosis</i> 0		positiv 173	abweichend 13
COI >= 1	0,00	20,00	2,00	164,00	92,00	1,00	0,00	0,00		positiv 164	<i>Differenzierung in Prozent</i> 51,8 %			prozentuale Abweichung 35,3 %

 positiv
  fraglich
  abweichend